N° D'ORDRE : 859

THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE (SCIENCES)

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR D'ETAT
Physiologie Végétale

PAR

Gérard MARIGO

POLYPHENOLS ET CROISSANCE VEGETALE
ESSAI D'EVALUATION DU ROLE JOUE *in vivo* PAR LES COMPOSES PHENOLIQUES CHEZ *Lycopersicum esculentum*

Soutenue le 9 Mars 1979 devant la Commission d'Examen

MM. A.	TOUZÉ, Professeur Université P. Sabatier Sciences	Président
J.L.	BONNEMAIN, Professeur Université Poitiers	Examinateurs
A.M.	BOUDET, Professeur P. Sabatier Sciences	
T.	GASPAR, Professeur Université de Liège	
R.	HELLER, Professeur Université Paris VII	
H.	KALDEWEY, Professeur Université des Saarlandes Sarrebruck (R.F.A.)	

N° D'ORDRE : 859

THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE (SCIENCES)

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR D'ETAT
Physiologie Végétale

PAR

Gérard MARIGO

POLYPHENOLS ET CROISSANCE VEGETALE
ESSAI D'EVALUATION DU ROLE JOUE in vivo
PAR LES COMPOSES PHENOLIQUES
CHEZ Lycopersicum esculentum

Soutenue le 9 Mars 1979 devant la Commission d'Examen

MM. A.	TOUZÉ, Professeur Université P. Sabatier Sciences	Président
J.L.	BONNEMAIN, Professeur Université Poitiers	Examinateurs
A.M.	BOUDET, Professeur P. Sabatier Sciences	
T.	GASPAR, Professeur Université de Liège	
R.	HELLER, Professeur Université Paris VII	
H.	KALDEWEY, Professeur Université des Saarlandes Sarrebruck (R.F.A.)	

UNIV.
LEIDEN
BIM.

UNIVERSITE PAUL SABATIER

PRESIDENCE

M. MARTIN ..... Président
M. LARENG ..... 1er Vice-Président
Mlle GOUYON ..... 2ème Vice-Président

ORDRE DES SCIENCES

HONORARIAT

M. BEDOS ..... Professeur honoraire
M. BLAIZOT ..... Doyen honoraire
M. CAPDECOMME .. Doyen honoraire, Recteur honoraire, Correspondant de l'Institut, Professeur honoraire
M. COUCHET ..... Professeur honoraire
M. DUPOUY ..... Membre de l'Institut, Doyen honoraire, Directeur Général honoraire du C.N.R.S., Professeur honoraire
M. DURAND Emile .. Doyen honoraire, Professeur honoraire
M. GAUSSEN ..... Professeur honoraire, Correspondant de l'Institut
M. MARGULIS ..... Professeur honoraire
M. MASDUPUY ..... Professeur honoraire
M. MATHIS ..... Doyen honoraire
M. MIGNONAC ..... Professeur honoraire
M. MIQUEL ..... Professeur honoraire
M. MORQUER ..... Professeur honoraire, Correspondant de l'Institut
M. SECONDAT ..... Professeur honoraire
M. TEISSIE-SOLIER . Professeur honoraire
M. VANDEL ..... Professeur honoraire, Membre de l'Institut
M. DUPIN ..... Professeur honoraire
M. TRICHE ..... Professeur honoraire
M. PERRIER ..... Professeur honoraire
M. GALLAIS ..... Professeur honoraire
M. LESBRE ..... Professeur honoraire
M. SERFATY ..... Professeur honoraire

CORPS ENSEIGNANT

PROFESSEURS

M. FERT ..... Physique
M. HURON ..... Mathématiques Appliquées
M. LEDOUX ..... Zoologie Appliquée
M. RIVALS ..... Agriculture
M. MATHIS ..... Chimie
M. ORLIAC ..... Géochimie et Minéralogie
M. LAFOURCADE .. Physique
M. ANGELIER ..... Zoologie
Mlle de FERRE ..... Botanique
M. FARRAN ..... Minéralogie et Géotechnique
M. LAUDET ..... Physique Théorique et Calcul Numérique
M. LAGASSE ..... Electrotechnique
M. BLANC ..... Physique Nucléaire
M. LEREDDE ..... Botanique
M. LELUBRE ..... Géologie
M. LALAGUE ..... Mathématiques Générales
M. BOUIGUE ..... Astronomie
M. ASSELINEAU .... Chimie Biologique
M. MAURET ..... Chimie Systématique
M. AGID ..... Physiologie
M. MONTANT ..... Cryptogamie
M. GAUTIER ..... Physique
M. CRUMEYROLLE . Mathématiques
M. GOURINARD .... Géologie
M. PULOU ..... Minéralogie
M. CAMBOU ..... Physique Spatiale
M. LACOSTE ..... Electrotechnique
M. THIBAULT ..... Mécanique Rationnelle et Appliquée
M. MASCART ..... Mathématiques
M. MEDIONI ..... Psychophysiologie
M. RAYNAUD P. .... Physiologie Animale
M. ZALTA ..... Chimie Biologique
M. SEVELY ..... Electrotechnique
M. POMMIEZ ..... Mathématiques
M. REY Paul ..... Biologie Végétale
M. COULOMB ..... Physique
M. TRINQUIER ..... Physique
M. MARONI ..... Chimie
M. BEETSCHEN .... Biologie Générale
M. DERACHE ..... Physiologie Animale
M. SATGE ..... Chimie Organique
M. LATTES ..... Chimie
M. VEDRENNE ..... Géophysique
M. DURAND-DELGA Géologie
M. CARRARA ..... Physique
M. MAHENC ..... Chimie
M. MIROUSE ..... Géologie
M. BITSCH ..... Zoologie
M. DEGEILH ..... Physique
M. MARTIN J.C. .... Génie Electrique
M. REY Gérard ..... Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. SICARD ..... Biologie Génétique
M. SOUQUET ..... Géologie
M. TOUZE ..... Physiologie Végétale
M. FRASNAY ..... Mathématiques (Algèbre et Combinatoire)
M. CASSAGNAU .... Zoologie
M. CAUSSINUS ..... Mathématiques Appliquées (Statistiques Appliquées)
M. PESCIA ..... Physique
M. PICCA ..... Physique de l'Atmosphère
M. BAUDIERE ..... Botanique Fondamentale et Pyrénéenne
M. BARRANS ..... Chimie Physique Organique
M. POILBLANC ..... Chimie Minérale
M. PERENNOU ..... Informatique
M. ATTEIA ..... Mathématiques
M. CASTAN ..... Informatique
M. COLLETTE ..... Physique
M. REME ..... Mesures Physiques

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. MERIC ..... Mathématiques Appliquées
Mme LECAL ..... Zoologie
M. PILOD ..... Physique
M. LARROQUE ..... Physique
Mlle LAPEYRE ..... Mathématiques - Informatique
M. BERTRAND ..... Chimie
M. DESQ ..... Mathématiques
M. ROCARD ..... Electronique
M. GUERIN ..... Mathématiques
M. SCHNEIDER ..... Biologie Cellulaire
M. de LOTH ..... Chimie Physique
M. SAPORTE ..... Physique
M. THENOZ ..... Génie Civil
M. DURAND Ph. .... Physique
M. FONTAN ..... Physique Nucléaire
M. BAUDRAS ..... Chimie Biologique
M. CALVET ..... Mécanique des Fluides
M. PAGANI ..... Physique
M. BEAUFILS ..... Informatique
M. BERTHELEMY ... Zoologie
M. TERJANIAN ..... Mathématiques
M. MORUCCI ..... Génie Biologique et Médical
M. BONEL ..... Chimie
M. SOTIROPOULOS . Chimie Organique
M. CUPPENS ..... Mathématiques
M. VERDIER ..... Physique
M. ETTINGER ..... Mathématiques
M. BONNET Louis ... Biologie
M. JOSSERAND .... Mesures Physiques
M. ROUTIE ..... Génie Chimique
M. COTTU ..... Génie Mécanique
M. HURAUX ..... Physique
Mme GERVAIS ..... Chimie Inorganique
M. BANCEL ..... Mathématiques
M. LOUARN ..... Génétique
M. BOUDET ..... Physiologie Végétale
M. LETAC ..... Mathématiques

PROFESSEURS ASSOCIES

M. GUMOWSKI ..... Mathématiques
M. SHELDON ..... Physique

MAITRES DE CONFERENCES

Mlle BARBANCE .... Mathématiques
M. GILLY ..... Génie Mécanique
M. MARAL ..... Physique
M. LEGRAND ..... Génie Civil
M. ABATUT ..... Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. MAUSS ..... Mécanique
M. BETOURNE ..... Informatique
M. CAMPAN ..... Psychophysiologie
M. CLERC ..... Mécanique
M. GRIFONE ..... Mathématiques
M. COUOT ..... Mathématiques, Analyse Numérique
M. NGUYEN THANH VAN Mathématiques
M. TRAVERSE ..... Problèmes Chimiques de l'Energie
M. ALRAN ..... Génie Chimique
M. REY J. ..... Géologie Sédimentaire et Paléontologie
M. DARTIGUENAVE Chimie Minérale Moléculaire
M. HERAULT ..... Chimie
M. PRADINES ..... Mathématiques
M. GALINIER ..... Informatique
M. VIGNOLLE ..... Informatique
M. DEPARIS ..... Embryologie
M. CAVALIE ..... Physiologie Végétale
M. MASSOL ..... Chimie des Composés Organiques et Organominéraux d'intérêt biologique
M. HARTMANN .... Mécanique
M. ROUSSET ..... Chimie Appliquée (Matériaux)
M. TARDY ..... Sciences de la Terre et Aménagement
M. HOLLANDE ..... Biologie Cellulaire
M. DUGAS ..... Physique des Energies Nouvelles

CHERCHEURS DU C.N.R.S.

DIRECTEURS DE RECHERCHE

M. GIRALT Georges
M. LABARRE Jean
M. LAURENT Jean-Pierre
M. LEGRIS
M. MARTINOT Henri
M. MAZEROLLES
M. NYSTERAKIS F.
M. PRADAL
M. WOLF Robert

MAITRES DE RECHERCHE

M. AGUILAR MARTIN José
Mme ASSELINEAU Cécile
M. AZEMA Pierre
M. BUXO Jean
Mme DARTIGUENAVE M.
M. ESTEVE Daniel
M. GALY Jean
M. HAWKES Peter
M. HOUALLA Doureid
M. JEREBZOFF
M. MALRIEU J.P.
Mme MARONI Yvette
Mme MATHIS
M. MUNOZ Aurélio
M. NAVECH
M. PRAJOUX Roland
M. SEVELY Jean
M. VACQUIE Serge

☆

CORPS DES OBSERVATOIRES ASTRONOMIQUES ET INSTITUTS DE PHYSIQUE DU GLOBE

Mme ANDRILLAT Y. Astronome titulaire
M. BOUIGUE Roger .. Astronome titulaire
M. COUPINOT G. ... Astronome adjoint
M. LEROY J. Louis .. Physicien adjoint
M. MIANES ..... Astronome adjoint
M. PEDOUSSAUT A. . Astronome adjoint
M. ROBLEY Robert .. Physicien titulaire
M. ROSCH Jean ..... Astronome titulaire
M. SAISSAC Joseph .. Physicien titulaire

☆ ☆ ☆

ADMINISTRATION

M. PRINEAU ..... Secrétaire Général de l'Université

Liste établie au 1er Octobre 1978
pour l'année universitaire 1978 - 1979

A mes parents, en hommage affectueux.

A Marguerite
A Myriam et Daniel
avec toute ma tendresse

A tous les miens.

Ce travail a été réalisé au Centre de Physiologie Végétale de l'Université Paul Sabatier de Toulouse (Laboratoire Associé au C.N.R.S. n° 241), sous la direction de Monsieur le Professeur A.M. BOUDET. Il a pu être entrepris grâce aux Professeurs A. BRUNEL et G. BRUNEL qui m'ont accueilli dans leur laboratoire alors qu'il dirigeaient ce Centre, me permettant d'entrer dans la carrière d'enseignant-chercheur. Je leur exprime aujourd'hui respectueusement ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur A. TOUZÉ, Directeur du Laboratoire Associé, m'honore en acceptant de présider le jury de cette thèse ; me souvenant qu'il avait déjà accepté de juger ma thèse de Doctorat de Spécialité, je le prie de trouver ici l'expression de ma gratitude pour l'attitude bienveillante qu'il a toujours eu à mon égard.

Monsieur A.M. BOUDET, à qui je dois ma formation de Chercheur m'a prodigué ses conseils tout au long de cette recherche. Il a su donner à nos échanges scientifiques et humains une qualité que j'ai beaucoup appréciée. Je suis très heureux à cette occasion de le remercier vivement pour la formation rigoureuse dont il m'a fait bénéficier et l'attention constante qu'il a portée à l'évolution de ce travail.

J'ai eu des discussions fructueuses avec Monsieur le Professeur J.L. BONNEMAIN, Professeur à l'Université de Poitiers, Membre de l'Institut ; je suis sensible à l'honneur qu'il me fait en examinant cette thèse en qualité de rapporteur.

Monsieur le Professeur H. KALDEWEY, Professeur à l'Université des Saarlandes (Sarrebruck, R.F.A.) a, malgré un emploi du temps chargé, bien voulu être l'un des rapporteurs ; je lui exprime ma profonde gratitude.

Messieurs R. HELLER, Professeur à l'Université Paris VII et T. GASPAR, Professeur à l'Université de Liège (Belgique), m'ont cordialement fait part de leurs remarques et suggestions ; ils me font l'honneur de faire partie du jury. Je les en remercie vivement.

La réalisation de ce mémoire a été largement tributaire de l'aide que beaucoup m'ont apportée :

- Messieurs J. BRUINSMA, Professeur à l'Université de Wageningen (Hollande) et E. KNEGT, Docteur, m'ont accueilli dans leur laboratoire et initié au dosage spectrophotofluorimétrique de l'auxine,

- Monsieur J.L. BUTOUR, Chercheur C.N.R.S. (Laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie Fondamentales du C.N.R.S. de Toulouse) m'a facilité l'accès auprès d'un spectrophotofluorimètre me permettant ainsi de réaliser une partie importante de ce travail.

Qu'ils trouvent ici l'expression de ma gratitude.

Il m'est particulièrement agréable de remercier mes différents camarades de l' "Equipe Polyphénols" :

- G. ALIBERT, R. RANJEVA et A. CARRASCO dont les suggestions et critiques judicieuses m'ont été d'un précieux encouragement,

- M. ROSSIGNOL et Melle N. DOUMENJOU pour leur collaboration efficace qui a contribué à divers titres à la progression de mon travail,

- Sans oublier l'aide morale des autres participants : Mesdames A. BOUDET, H. BOUYSSOU, A. GRAZIANA, Melle S. FONTAINE et C. GRAND.

Je tiens à exprimer d'autre part mes remerciements à Madame A.M. VIALLELE qui a apporté son concours à la réalisation dactylographiée de ce mémoire, à Madame R. ROUSSIHLES pour son aide efficace, à MM. B. DUPONT, J. ORLEAC et P. SINTES pour leur dévouement.

Enfin que tous mes collègues enseignants du Centre de Physiologie Végétale croient en mes sentiments les plus cordiaux pour leur témoignage de sympathie.

SOMMAIRE

Pages

RESUME 1

ABREVIATIONS 3

INTRODUCTION 5

RAPPELS SUR LE ROLE DES POLYPHENOLS DANS LA CROISSANCE ET LE DEVELOPPEMENT DES VEGETAUX 7

A - EFFETS DES COMPOSES PHENOLIQUES SUR LA CROISSANCE ET LE DEVELOPPEMENT DES VEGETAUX 7

1.- Introduction 7

2.- Composés phénoliques et croissance 10

3.- Composés phénoliques et morphogénèse 10

B - EXISTENCE D'INTERACTIONS ENTRE COMPOSES PHENOLIQUES ET PHYTOHORMONES 12

1.- Différents types de relations entre composés phénoliques et hormones végétales 12

2.- Examen particulier de l'intervention des composés phénoliques dans le catabolisme de l'AIA 15

C - POLYPHENOLS ET PROCESSUS BIOCHIMIQUES ASSOCIES A LA CROISSANCE ET AU DEVELOPPEMENT 19

1.- Polyphénols et activités enzymatiques 19

2.- Composés phénoliques et métabolisme énergétique... 20

3.- Polyphénols et potentiel d'oxydo-réduction..... 21

4.- Intervention particulière des produits d'oxydation des phénols..... 22

5.- Polyphénols et modification de la perméabilité membranaire 22

6.- Polyphénols et paroi 22

D - CONCLUSION 23

PREMIERE PARTIE

ETUDE DES EFFETS DES POLYPHENOLS SUR LA CROISSANCE CHEZ Lycopersicum esculentum

CHAPITRE I - REPERCUSSIONS D'UNE STIMULATION DU CONTENU PHENOLIQUE SUR LA CROISSANCE DE PLANTS DE TOMATE 27

A - MATERIEL ET METHODES 27

1.- Matériel végétal 27

2.- Méthodes de dosage des composés phénoliques..... 28

3.- Appréciation de la croissance des plants de Tomate .. 29

B - MODALITES DE STIMULATION DU POOL PHENOLIQUE 30

1.- Choix du précurseur 30

2.- Contrôle de l'absorption de l'acide quinique au cours du traitement 31

3.- Modifications quantitatives et qualitatives du pool phénolique..... 33

4.- Mode d'utilisation de l'acide quinique dans la synthèse des composés phénoliques..... 35

C - EFFET D'UNE AUGMENTATION DE LA TENEUR EN COMPOSES PHENOLIQUES SUR LA CROISSANCE DE Lycopersicum esculentum 39

1.- Mise en évidence d'un ralentissement de croissance de plants de Tomate traités par l'acide quinique 41

2.- Preuves de l'intervention des composés phénoliques dans les modifications de croissance 43

CONCLUSION ET DISCUSSION 47

CHAPITRE II - RECHERCHES PRELIMINAIRES SUR LES MODALITES D'ACTION DES COMPOSES PHENOLIQUES DANS LES MODIFICATIONS DE CROISSANCE 49

A - METHODOLOGIE 49

1.- Isolement de différentes familles de constituants biochimiques - Méthodes de dosage retenues..... 49

2.- Extraction, purification et dosage des acides phénoliques..... 50

B - INFLUENCE DU TRAITEMENT SUR LES TENEURS EN DIFFERENTS CONSTITUANTS BIOCHIMIQUES 51

1.- Composés phénoliques et métabolisme fondamental..... 51
2.- Répercussions du traitement sur le métabolisme secondaire..... 53
C - EVALUATION D'EVENTUELLES MODIFICATIONS DU CONTENU HORMONAL 55

CONCLUSION 58

CHAPITRE III - MISE EN EVIDENCE D'UNE SITUATION HYPERAUXINIQUE CHEZ DES PLANTS DE TOMATE TRAITES PAR DES PRECURSEURS DU METABOLISME PHENOLIQUE 61
A - METHODE DE DOSAGE DES SUBSTANCES AUXINIQUES 62
B - MODIFICATIONS DU CONTENU EN SUBSTANCES A ACTIVITE AUXINIQUE LORS DE TRAITEMENTS PAR L'ACIDE QUINIQUE ET LA PHENYLALANINE 63
1.- Teneur en acide phénylacétique 63
2.- Teneur en acide β-indole acétique 65
C - STIMULATION PHENOLIQUE ET HYPERAUXINIE : PHENOMENES RELIES OU INDEPENDANTS ?.....66
1.- Etude d'un effet direct (précurseur) de l'acide quinique et de la phénylalanine sur la synthèse de l'AIA 67
2.- Influence d'un apport d'acide cinnamique 68
3.- Appréciation de l'état auxinique de plants dont la teneur en phénols est stimulée..... 69
D - HYPERAUXINIE ET LIGNIFICATION 70
1.- Méthodes expérimentales 71
2.- Résultats 73

CONCLUSION ET DISCUSSION 75

DEUXIEME PARTIE

MECANISMES D'ACTION DES COMPOSES PHENOLIQUES DANS LES MODIFICATIONS DU CONTENU AUXINIQUE

CHAPITRE I - INTERVENTION DES COMPOSES PHENOLIQUES EN TANT QUE PROTECTEURS D'AUXINE 81

A - METHODES EXPERIMENTALES 81

1.- Mesure des transformations de l'AIA ^{14}C *in vivo* 81

2.- Obtention et purification d'extraits oxydasiques..... 81

3.- Mesure des activités oxydases..... 82

4.- Extraction, identification et dosage des composés phénoliques..... 82

B - MISE EN EVIDENCE D'UN RALENTISSEMENT DE LA DEGRADATION DE L'AUXINE CHEZ DES PLANTS DE TOMATE TRAITES PAR L'ACIDE QUINIQUE 83

1.- Etude de l'utilisation de l'AIA ^{14}C *in vivo*..... 83

2.- Comparaison des activités AIA oxydase dans différents organes de plants témoins et traités par l'acide quinique 84

C - ETUDE DES INHIBITEURS DE L'AIA OXYDASE 85

1.- Existence d'inhibiteurs phénoliques de l'AIA oxydase . 85

2.- Identification des inhibiteurs de type protecteur d'auxine : l'acide chlorogénique 87

3.- Etude du mode d'action de l'acide chlorogénique en tant que protecteur d'auxine 89

CONCLUSION 92

CHAPITRE II - COMPOSES PHENOLIQUES ET TRANSPORT POLARISE DE L'AUXINE 95

A - INTRODUCTION - TRANSPORT DE L'AUXINE ET THEORIES SUR LA POLARITE 95

1.- Caractéristiques du transport de l'auxine 95

2.- Théories sur la polarité du transport auxinique 96

B - EFFET INHIBITEUR DES COMPOSES PHENOLIQUES SUR LE TRANSPORT POLARISE DE L'AUXINE CHEZ *Lycopersicum* 98

1.- Définition d'un protocole expérimental en vue d'apprécier le mouvement polarisé de l'auxine 98

2.- Effet d'un traitement par l'acide quinique sur la translocation de l'AIA 101

3.- Démonstration du rôle des composés phénoliques dans le transport polarisé de l'auxine 105

4.- Conclusion 106

C - NATURE DES PHENOLS IMPLIQUES DANS LES MODIFICATIONS DU TRANSPORT DE L'AIA ET ETUDE DE LEUR MODE D'ACTION.... 107

1.- Recherche de la nature des composés phénoliques intervenant dans le ralentissement du transport de l'AIA 107

2.- Recherche de "récepteurs" de l'auxine chez Lycopersicum 110

3.- Mise en évidence de modifications du pH cellulaire : répercussions sur le transport de l'auxine..... 112

CONCLUSION - DISCUSSION 118

CONCLUSIONS GENERALES 121

ANNEXE 131

BIBLIOGRAPHIE 141

RESUME

Les fonctions physiologiques des composés phénoliques d'origine végétale demeurent encore actuellement mal définies. Si de nombreux travaux tendent à leur attribuer un rôle dans le développement des plantes, la plupart des expériences font intervenir des additions de polyphénols exogènes à des organes excisés en survie ou à des tissus en culture et s'avèrent insuffisantes pour démontrer leur réelle action in vivo.

Ce travail représente une tentative nouvelle d'évaluation du rôle des polyphénols dans la croissance végétale. Il porte sur des plants entiers de Tomate dont on stimule de façon contrôlée le pool phénolique par apport de précurseurs du métabolisme aromatique.

Deux aspects particuliers ont été considérés :

- le retentissement d'un accroissement du contenu phénolique sur la croissance,
- le mode d'action de ces composés dans les modifications constatées.

Dans la première partie on envisage :

1°) La définition des modalités de stimulation du pool phénolique, en retenant comme précurseur l'acide quinique ; celui-ci fourni au niveau du système radiculaire de jeunes plants de Tomate en croissance est rapidement absorbé et utilisé notamment dans la synthèse de depsides (représentés pour une large part par des isomères de l'acide chlorogénique).

2°) L'incidence du traitement sur la croissance des plants et leur constitution biochimique. Les plants traités subissent une réduction de croissance (ralentissement de la division mais aussi de l'élongation cellulaire) intéressant essentiellement les parties aériennes. Cette réponse du végétal, qui est toujours et seulement associée à des traitements par des précurseurs du métabolisme phénolique (acide quinique, phénylalanine, acide cinnamique) semble dépendre de la production accrue en polyphénols.

Sur un plan biochimique les teneurs en protéines et en chlorophylles n'étant pas affectées, il semble que le métabolisme fondamental ne subisse pas de perturbations trop importantes. En revanche, un effet marqué est relevé dans la proportion respective des matériaux constitutifs de la paroi (diminution des teneurs en cellulose, augmentation de la fraction lignines).

Des apports exogènes d'hormones réalisés en vue de caractériser la nature d'un éventuel déséquilibre hormonal des plants traités ont révélé indirectement l'existence d'une situation "hyperauxinique".

Ce fait a par la suite été confirmé en estimant par spectrophotofluorimétrie les teneurs en auxine : dans les parties aériennes des plants traités, celles-ci sont sensiblement huit fois plus élevées et subissent donc une augmentation spectaculaire. Des observations complémentaires portant sur des plants soumis à différents traitements ont permis par ailleurs de relier ces modifications du contenu en AIA à la stimulation du pool phénolique.

Dans la deuxième partie du travail, on envisage le mode d'action des composés phénoliques dans les modifications des teneurs en AIA.

Les expériences effectuées ont conduit à distinguer deux niveaux d'intervention possibles des composés phénoliques :

- retard de la destruction oxydative de l'auxine,
- ralentissement du transport polarisé de l'AIA.

L'acide chlorogénique dont la teneur est stimulée préférentiellement au cours du traitement jouerait un rôle prépondérant en tant que "protecteur" d'auxine, comme cela a été évoqué dans la littérature. L'étude in vitro de la cinétique de dégradation de l'AIA en présence de l'o-diphénol démontre l'oxydation préférentielle de ce dernier pendant la période qui précède la destruction de l'auxine. Différents résultats et en particulier l'identification de produits d'oxydation de l'acide chlorogénique, en quantités plus importantes dans les plants traités, suggèrent l'intervention in vivo de cette compétition entre le diphénol et l'AIA.

En ce qui concerne le transport polarisé de l'AIA, diverses expériences réalisées sur des plants entiers ou des segments d'organes démontrent nettement que les polyphénols inhibent spécifiquement la migration des auxines (AIA - NAA) de l'apex vers les organes souterrains. L'action des phénols paraît plus particulièrement redevable de leurs formes oxydées. Une éventuelle compétition entre composés phénoliques et AIA au niveau des "récepteurs" impliqués dans le transport polarisé pouvait être envisagée. Cependant, il n'a pas été possible de caractériser chez Lycopersicum esculentum une fixation spécifique de l'auxine sur des constituants de fractions solubles ou membranaires. Par contre, des variations de pH cytoplasmique ont été relevées en étudiant la pénétration du diméthyl-5-5 oxazolidine 2-4 dione ^{14}C sur des segments d'hypocotyle. Ces modifications pourraient intervenir en favorisant, dans le cas de plants dont la teneur en phénols est stimulée, les phénomènes de diffusion de l'AIA au détriment de la phase de secrétion polaire.

L'ensemble de ces résultats permet donc d'apporter de nouvelles précisions sur les effets inhibiteurs des polyphénols dans la croissance. La stimulation du pool phénolique entraîne, chez Lycopersicum, l'apparition d'une situation hyperauxinique redevable en particulier de perturbations dans le transport polarisé de l'AIA. Ce résultat original permet d'entrevoir, à côté des hypothèses plus classiques concernant la modulation de l'activité AIA oxydase, de nouvelles implications des polyphénols dans la régulation du développement. Ainsi, soit dans les conditions normales de fonctionnement, soit dans les états de stress pour lesquels les teneurs en phénols sont particulièrement stimulées, ces composés pourraient jouer un rôle de médiateurs dans l'établissement de concentrations locales en auxine et être à l'origine de réponses morphogénétiques.

ABREVIATIONS UTILISEES

I - ENZYMES

HRP : horse radish peroxydase

PPO : polyphénol oxydase

II - HORMONES et ANALOGUES

AIA : acide β-indole acétique

ANA : acide naphtalène acétique

2,4-D : acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

APA : acide phénylacétique

GA_3 : acide gibberellique

TIBA : acide triiodobenzoïque

ANP : acide naphtyl phtalamique

III - AUTRES COMPOSES

GSH : glutathion réduit

NAD(P) H et NAD(P) H_2 : nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) réduit

ATP : adénosyl triphosphate

ADN : acide désoxyribonucléique

DNP : dinitrophénol

DMO : diméthyl 5-5 oxazolidine 2-4 dione

EDTA : éthylène diamino-tétra acétique

PEG : polyéthylène glycol

Tris : tri (hydroxy-méthyl) amino-méthane

INTRODUCTION

Le problème du rôle joué par les polyphénols dans la physiologie des plantes a,depuis longtemps,intrigué les chercheurs frappés par les fortes teneurs des végétaux supérieurs en ces composés. Ces métabolites secondaires ont fréquemment été impliqués dans les relations entre la plante et son environnement (SWAIN, 1977) ou dans le fonctionnement "intrinsèque" de l'organisme végétal (KEFELI et KADYROV, 1971). Dans ce dernier cas cependant, en dehors du processus de lignification, on ne dispose encore actuellement d'aucune certitude quant à la signification de la présence de la plupart d'entre eux. A ce propos, il est révélateur de constater qu'HARBORNE, l'un des meilleurs spécialistes de la question, insistait déjà en 1964 "sur l'activité des polyphénols dans le métabolisme des plantes" et sur le fait "que ce ne sont en aucune façon des produits inertes" mais reconnaissait en 1975 "que la fonction des flavonoïdes dans les feuilles, par exemple, restait obscure". Pourtant, à la suite de nombreuses études, un rôle leur a été fréquemment attribué dans la régulation de la croissance et du développement. Ce niveau d'intervention fait néanmoins l'objet de controverses en raison des techniques d'approche utilisées, des caractéristiques de la compartimentation cellulaire des polyphénols et des observations contradictoires parfois enregistrées.

Ces diverses considérations m'ont amené à rechercher un modèle pouvant permettre une nouvelle approche de ce problème, l'idée de base étant de stimuler spécifiquement la production des composés phénoliques endogènes du végétal par l'apport d'un précurseur et d'examiner les répercussions sur la croissance.

L'étude entreprise chez Lycopersicum esculentum Mill. variété Saint Pierre, comprend deux parties distinctes.

Après une mise au point bibliographique sur le problème de l'intervention des composés phénoliques dans les processus de croissance et de développement, je présenterai successivement dans une première partie :

- le modèle expérimental : conditions de stimulation et répercussions de l'augmentation des teneurs en polyphénols sur la croissance de plants de Tomate,

- les caractéristiques biochimiques essentielles des plants ayant subi une stimulation du pool phénolique et corrélativement une réduction de croissance.

- les résultats permettant de conclure à des modifications du contenu en auxine des plants traités.

Pour mieux comprendre les relations composés phénoliques - AIA, j'envisagerai, dans la deuxième partie, le rôle des polyphénols dans le processus de dégradation de l'auxine ainsi que dans le transport polarisé de cette molécule.

RAPPELS SUR LE ROLE DES POLYPHENOLS DANS LA CROISSANCE ET LE DEVELOPPEMENT DES VEGETAUX

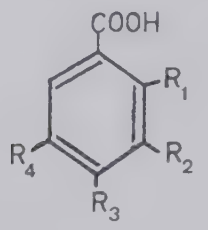
A - EFFETS DES COMPOSES PHENOLIQUES SUR LA CROISSANCE ET LE DEVELOPPEMENT DES VEGETAUX

1.- Introduction

Par rapport aux chercheurs de toutes tendances (phytochimistes, biochimistes, généticiens) oeuvrant dans le domaine des polyphénols, les biologistes ne se sont intéressés qu'assez tard à la signification physiologique des composés phénoliques. En effet, en dehors des lignines qui assurent un rôle de soutien, ces derniers ont longtemps été considérés comme des produits incapables d'assumer une fonction quelconque. Les premières opinions sur leur rôle éventuel ont concerné les relations entre la plante et d'autres composantes des écosystèmes : défense contre les agressions parasitaires, pigments colorés représentant "des signaux" capables d'attirer insectes et oiseaux favorisant ainsi indirectement la pollinisation, intervention dans les phénomènes d'allélopathie. Rencontrés très souvent à l'état de glucosides, on a également estimé qu'ils serviraient de réserves glucidiques pour la plante, le rôle de l'aglycone demeurant inconnu.

Leur intervention dans la croissance et le développement a été suggéré à la suite de nombreux résultats obtenus durant ces vingt dernières années. Les premiers travaux découlent d'observations déjà anciennes montrant que certaines plantes étaient capables de faire le "vide" autour d'elles empêchant les autres d'y germer et de se développer. L'étude plus approfondie de ce phénomène, que l'on convint de désigner sous le terme d'allélopathie (MOLISCH, 1937), devait montrer que ces végétaux agissaient de la sorte en émettant des substances toxiques dans le milieu environnant. Longtemps la nature chimique de ces inhibiteurs de croissance naturels est restée obscure ; il fallut attendre les travaux de BONNER et GALSTON en 1944 portant sur l'identification de l'acide cinnamique comme substance toxique isolée de racines de Guayule pour entrevoir la participation des composés phénoliques.

I-ACIDES BENZOÏQUES



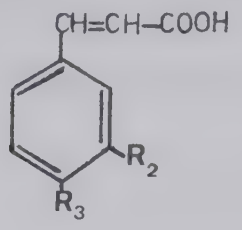
Ac. p-hydroxy benzoïque $R_1, R_2, R_4 = H$; $R_3 = OH$

Ac. salicylique $R_2, R_3, R_4 = H$; $R_1 = OH$

Ac. gentisique $R_1, R_4 = OH$; $R_2, R_3 = H$

Ac. gallique $R_2, R_3, R_4 = OH$; $R_1 = H$

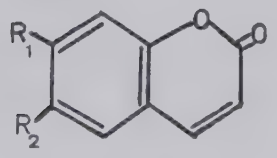
II-ACIDES CINNAMIQUES



Ac. p-coumarique $R_2=H$ $R_3=OH$

Ac. férulique $R_2=R_3 = OCH_3$

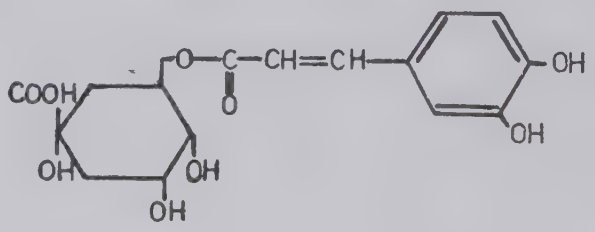
III-COUMARINES



Coumarine $R_1, R_2 = H$

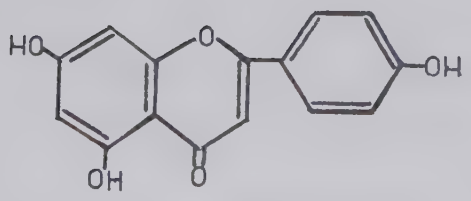
Scopolétine $R_1 = OH$; $R_2 = OCH_3$

IV-DEPSIDE

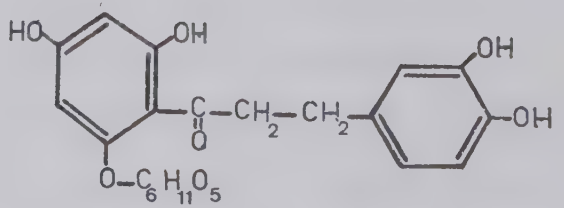


Ac. chlorogénique

V-FLAVONOÏDES



Naringénine



Phloridzine

Figure 1 - Structure chimique des principaux inhibiteurs de croissance, de nature phénolique, identifiés chez les végétaux.

Ce même effet fût étendu par la suite à différents polyphénols, en particulier par utilisation de tests nombreux portant sur la germination de graines d'espèces variées (Lepidium sativum, Lactuca sativa, Orge, etc...). De nombreux ouvrages (RICE, 1974) et revues (KEFELI et KADYROV, 1971) décrivent en détail leurs propriétés. Parmi les composés rendus responsables de certaines inhibitions de croissance on peut citer les acides salicylique, gentisique, p-hydroxybenzoïque, gallique dans la série des acides benzoïques (I), des dérivés de l'acide cinnamique (II), coumarine et scopolétine (III), l'acide chlorogénique (un depside, IV) et des flavonoïdes (V) comme la naringénine et la phloridzine (Figure 1).

Les différents organes d'une plante sont susceptibles de contenir et de secréter ces inhibiteurs. Les radicelles en particulier laissent diffuser dans le sol des composés phénoliques (ROVIRA, 1969); de même les parties aériennes soit par "lessivage" des feuilles et de l'écorce par les eaux de pluie (TUKEY, 1970), soit par décomposition lorsqu'elles tombent sur le sol libèrent également des phénols. Etant donné que les graines, suivant leur appartenance à telle ou telle espèce, résistent plus ou moins bien à l'action des inhibiteurs phénoliques en y étant plus ou moins sensibles, on conçoit l'importance de ces influences réciproques dans l'équilibre de la végétation.

Au-delà de ces premières études, l'idée s'est répandue selon laquelle les polyphénols produits par les plantes pourraient intervenir dans la régulation de leur propre développement. Cette hypothèse repose sur trois sortes d'arguments :

- l'effet d'apports exogènes de polyphénols sur le développement,
- l'observation de variations des teneurs en composés phénoliques précédant ou accompagnant des événements physiologiques de la vie de la plante,
- la mise en évidence de modifications du taux en certains polyphénols lors de l'application de stimuli divers (hormones, lumière, etc...) conduisant à des réponses au niveau de la croissance et de la morphogénèse.

Le premier argument a été surtout retenu dans le cas du développement, les deux suivants plus particulièrement dans le cadre des phénomènes de différenciation.

Dans l'analyse bibliographique que je vais entreprendre maintenant sur le rôle des polyphénols dans les phénomènes de croissance et de différenciation, je me contenterai d'évoquer, parmi les nombreuses observations rapportées à ce jour, celles qui me paraissent les plus significatives.

2.- Composés phénoliques et croissance

Différents travaux réalisés selon le principe des tests biologiques et portant sur l'allongement de coléoptiles (WADA, 1961 ; MUMFORD et STARK, 1963 ; TOMASZEWSKI, 1964), d'hypocotyles et d'épicotyles (TOMASZEWSKI, 1964) mais également sur l'expansion foliaire (ISAIA, 1971 ; JONES, 1976) et l'élongation du système radiculaire (SVENSSON, 1971) ont souligné l'influence, le plus souvent inhibitrice, des polyphénols dans les processus de croissance.

Jusqu'en 1960, ces substances ont globalement été considérées comme des inhibiteurs. Par la suite, l'utilisation de tests plus diversifiés portant notamment sur des explantats cultivés in vitro permit de démontrer que certains phénols possédaient également la propriété de favoriser la croissance. Ainsi les catéchines déterminent une augmentation de la teneur en matière sèche de tissus de Carotte cultivés in vitro (NAEF , 1971), et l'épicatéchine contenu dans le jus de Tomate stimule la croissance de tissus de Topinambour (NITSCH et PARIS, 1962). De même les acides caféique, férulique, p-coumarique et chlorogénique provoquent soit sur des germes de Pomme de terre cultivés in vitro, soit sur des boutures une avance de la tubérisation (PAUPARDIN et TIZIO, 1970). Cet effet se révèle parfois spécifique de certains composés particuliers : parmi différentes substances phénoliques testées in vitro seuls l'acide p-coumarique et la vanilline favorisent l'élongation de jeunes plantules de Pin (MICHNIEWICZ et GALOCH, 1974).

3.- Composés phénoliques et morphogénèse

Les composés phénoliques semblent intervenir dans presque tous les phénomènes de morphogénèse, leur "potentiel" d'activité biologique étant très grand, à l'image de leur diversité structurale. A l'aide de quelques exemples on peut situer les aspects les plus importants de leur intervention, tout en remarquant que la plupart des hypothèses proviennent d'expériences réalisées in vitro.

- Selon la théorie des rhizocalines due à BOUILLENNE, l'initiation des racines nécessiterait l'intervention de substances spécifiquement rhizogènes dont une serait de nature phénolique (BOUILLENNE, 1964). Les arguments justifiant une telle hypothèse sont de deux ordres. Tout d'abord une accumulation de substances phénoliques se produit dans la région des boutures où apparaissent les racines (BASTIN, 1966; FERNQUIST, 1966). Cette observation n'apparaît pas cependant déterminante car de telles accumulations sont la conséquence normale de "stress" de nature diverse (PRIDHAM, 1960), comme ici l'ablation du système radiculaire. Le deuxième argument est constitué par les sti-

mulations de la rhizogénèse obtenues en traitant des boutures par diverses substances phénoliques (HESS, 1965 ; GORTER, 1969 ; BASU et al., 1969 ; VASQUEZ, 1973, 1974), preuve qui ne va pas non plus en faveur de la spécificité de la rhizocaline décrite par BOUILLENNE.

- On a également suggéré que les composés phénoliques peuvent jouer un rôle dans la formation des bourgeons (LEE et SKOOG, 1965 ; ZUCKER et al., 1965 ; PAULET, 1965, 1966). PAULET, par exemple, montre sur des fragments de tiges de Nicotiana suaveolens cultivés in vitro que l'acide chlorogénique et la rutine inhibent le bourgeonnement végétatif et stimulent la rhizogénèse. Sur l'Endive, les acides chlorogénique et p-coumarique stimulent la formation de bourgeons floraux à faible concentration, mais les acides caféique, férulique, la quercétine et le kaempférol, sont inactifs.

- La mise à fleur semble partiellement sous la dépendance de l'acide chlorogénique par l'intermédiaire du photopériodisme (KONISHI et GALSTON, 1964 ; ZUCKER et al., 1965). PARIS et al. (1968) constatant une augmentation de la teneur en flavones et en acides phénols au début de la floraison chez Anthenis nobilis déduisent que les phénols sont impliqués dans ce processus. ENGELSMA (1969) trouve un rapport entre l'induction de la floraison et la synthèse des composés phénoliques chez les plantes de jours longs. CABANNE et al. (1975) relevant l'apparition de phénolamines chez différentes plantes lors de l'expression florale, proposent de considérer ces composés comme des "marqueurs" de la floraison ; cependant, ces travaux ne permettent pas d'apprécier si la présence de ces substances est une cause ou une conséquence de la floraison. Enfin, d'autres observations suggèrent une action possible des acides salicylique (CLELAND et AJAMI, 1974 ; NANDA et al., 1976 ; KHURANA et MAHESHWARI, 1978), gallique (PRYCE, 1972), tannique (NANDA et KUMAR, 1977).

Après fécondation, la croissance du jeune fruit (NITSCH, 1970) puis sa maturation ultérieure (WARDALE, 1973) semblent être régulées par le rapport de la teneur en monophénols à celle des orthodiphénols.

- Enfin, on peut noter la participation de certaines coumarines dans des phénomènes physiologiques comme le géotropisme et le phototropisme des végétaux (HARADA et KOIZUMI, 1971).

L'ensemble de ces différents travaux fournit un très large faisceau de présomptions en faveur de l'intervention potentielle des composés phénoliques dans les processus du développement. Cependant, ni le fait d'observer des corrélations in vivo, ni d'obtenir in vitro

des stimulations ou des inhibitions sous l'influence de substances exogènes ne constitue une preuve déterminante de la participation ce celles-ci au fonctionnement normal du végétal.

Ces premières observations ont souvent été à la base des études ultérieures qui ont tenté d'apporter des précisions sur les niveaux d'intervention des polyphénols en termes biochimiques.

Ces recherches peuvent être regroupées en deux axes essentiels que j'envisagerai successivement :

- influence des polyphénols au niveau hormonal,
- répercussion plus générale sur le métabolisme des végétaux.

B - EXISTENCE D'INTERACTIONS ENTRE COMPOSES PHENOLIQUES ET PHYTOHORMONES

1.- Différents types de relations entre composés phénoliques et hormones végétales

- Phénols - acide indole acétique

L'idée selon laquelle les composés phénoliques agiraient en relation avec l'auxine dans les phénomènes de croissance s'est développée à la suite des travaux de HEMBERG (1951) qui observe que l'acide caféique seul, a un effet négligeable dans le test de courbure du coléoptile d'Avoine alors qu'il manifeste en mélange avec l'AIA une action synergique. Depuis, un nombre considérable d'expériences réalisées en utilisant des tests d'élongation portant sur des segments d'organes (Tableaux I et II, pages 14 et 16) devait montrer que la stimulation provoquée par l'acide indolyl-3 acétique pouvait être profondément modifiée par la présence simultanée de composés phénoliques. Certains comme les acides p-hydroxybenzoïque, vanillique, p-coumarique inhibent l'effet de cette hormone (effet antagoniste), d'autres parmi lesquels les acides caféique, sinapique, chlorogénique la quercétine, la rutine ou la catéchine l'exaltent au contraire. On a également signalé l'action stimulante de certains polyphénols en présence d'auxine sur la croissance de tissus cultivés *in vitro* (NITSCH et NITSCH, 1959), sur la croissance et la formation de bourgeons (LEE et SKOOG, 1965), sur la rhizogénèse de boutures de *Phaseolus* (GORTER, 1962), d'épicotyles de Pois (TOMASZEWSKI, 1964) ou d'explantats de Topinambour cultivés *in vitro* (RUCKER et PAUPARDIN, 1969).

- Phénols - gibberelline

Comparativement au nombreux exemples illustrant les interactions phénols - auxine, peu de travaux font état de rapports avec les autres hormones végétales. Cependant, quelques observations de ce type ont été réalisées plus récemment en ce qui concerne l'action stimulante des gibberellines. Au cours de ces interactions les polyphénols

interviennent de deux manières différentes :

- soit en contrecarrant l'action de cette hormone ; c'est le cas des acides coumarique, chlorogénique durant l'élongation de la première feuille de Blé (ISAIA, 1971), ainsi que différentes catégories de tannins sur l'allongement d'hypocotyles de Pois nains (CORCORAN et al., 1972 ; GREEN et CORCORAN, 1975),

- soit en la renforçant comme le fait l'alcool dihydroconiféry-lique dans le test "hypocotyles de Laitue" (SHIBATA et al., 1974). Il est à noter, cependant, que l'effet de ce composé ne concerne pas spécifiquement l'action des gibberellines puisque celui-ci agit aussi en synergie avec l'auxine (SAKURAI et al., 1974).

On a également observé, lors de la tubérisation de germes de Pomme de terre cultivés in vitro, des interactions qui dépendent des concentrations en gibberelline : pour des doses élevées les acides caféique, férulique et p-coumarique renforcent son action retardatrice, mais au-dessous d'un certain niveau, exaltent l'effet stimulant qu'elle semble exercer à ce moment là (PAUPARDIN et TIZIO, 1970).

- Phénols - éthylène

Des relations entre composés phénoliques et éthylène ont été suggérées dans la maturation dont le déclenchement est classiquement rattaché à la production de cette hormone par le fruit. MAPSON et WARDALE (1967, 1968) puis MAPSON et MEAD (1968) ont pu montrer que la conversion enzymatique de la méthionine et de ses dérivés en éthylène exige l'action d'une peroxydase et d'un certain nombre de cofacteurs dont les esters de l'acide p-coumarique ; dans les mêmes conditions, divers autres acides phénoliques, dont les esters caféique sont inhibiteurs, et WARDALE (1973) a pu établir chez la Tomate une relation entre les évolutions relatives des esters p-coumarique et caféique, d'une part, et la synthèse d'éthylène par le fruit, d'autre part.

Des hypothèses du même type ont, par ailleurs, été proposées pour expliquer les relations phénols - éthylène au cours de la croissance du système radiculaire chez le Cresson (ROBERT et al., 1976).

- Phénols - kinétine

Pour terminer ce bilan des rapports entre composés phénoliques et hormones végétales, on peut relever un effet antagoniste de la coumarine vis-à-vis de la kinétine lors de la croissance en épaisseur de l'hypocotyle de Haricot (HOGETSU et al., 1974).

TABLEAU I

Monophénols, activateurs du système AIA oxydase *in vitro* et exerçant une action antagoniste à celle de l'auxine dans différents test de croissance

Composés phénoliques (par séries)	Origine de l'AIA oxydase dans le cas d'études sur l'enzyme *in vitro*	Nature du "test biologique"	Auteurs des travaux
Acides benzoïques			
Ac. p-hydroxybenzoïque		Mésocotyle d'avoine . . (allongement)	.Nitsch et Nitsch (1962)
	Epicotyles de Pois . . .	. . . . .	Tomaszewski et Thimann (1966)
	Coléoptiles d'Avoine. .	Courbure du coléoptile d'Avoine.	Tomaszewski (1964)
Ac. vanillique	Coléoptiles d'Avoine. .	Courbure du coléoptile d'Avoine	.Tomaszewski (1964)
Acide cinnamique			
Ac. p-coumarique	Epicotyles de Pois. . . .	. . . . .	.Andreae et Collet (1968)
	Ananas		Gortner *et al*. (1958)
		Coléoptile d'Avoine (élongation de segments).	.Munford et Stark (1963)
	Coléoptiles d'Avoine. . .	. . . . .	.Tomaszewski et Thimann (1966)
		Hypocotyle de Tournesol	.Tomaszewski (1964)
Acide phénylacétique			
Ac. p-hydroxyphénylacétique	Tissus de fraisiers. . .	. . . . .	.Runkova *et al*. (1972)
Coumarines			
4 méthyl umbelliferone	Pois.	Epicotyle de Pois. . . (allongement de segments) . . .	.Andreae et Andreae (1953) Andreae et Collet (1968)
Scopolétine	Ananas.	. . . . .	.Gortner *et al*. (1958)
	Pois.	. . . . .	.Munford *et al*. (1961)
	Racines de Patate douce .	. . . . .	Imbert et Wilson (1970)
Flavonoïdes			
kaempférol	Pois.	. . . . .	Munford *et al*. (1961) Furuya *et al*. (1962)

2.- Examen de l'intervention des composés phénoliques dans le catabolisme de l'AIA

Il apparaît à l'examen des résultats précédents que les composés phénoliques peuvent agir soit en modifiant l'expression d'un "contexte" hormonal préexistant (dans ce cas, leur nature d'inhibiteurs peu spécifiques pourrait être à l'origine des résultats observés) soit en perturbant le contenu hormonal des tissus (synthèse, dégradation). Les résultats les plus précis ont été obtenus en relation avec cette seconde possibilité. Ils concernent essentiellement le rôle des polyphénols dans le contrôle de la dégradation de l'auxine via une modulation de l'activité AIA oxydase (Tableaux I et II, pages 14 et 16).

L'ensemble des résultats obtenus a conduit plusieurs auteurs à formuler des conclusions générales sur le mode d'action de ces substances (HENDERSON et NITSCH, 1962 ; NITSCH et NITSCH, 1962 ; TOMASZEWSKI et THIMANN, 1966) :

- les composés monohydroxylés qui activent les auxines oxydases réduiraient la croissance en entraînant une "consommation" accrue de l'auxine endogène.

- les termes di ou polyhydroxylés, inhibiteurs de ces enzymes, détermineraient une stimulation de l'allongement qui serait due à une "économie" en cette hormone.

Pour justifier ce mode d'intervention des phénols basé, au départ, sur de simples corrélations entre effets produits respectivement sur l'élongation de segments et l'activité du système AIA oxydase in vitro, certains auteurs tentèrent d'apporter des preuves supplémentaires. Ainsi en 1962, HENDERSON et NITSCH montrent que dans le test d'élongation du mésocotyle d'Avoine l'effet synergique manifesté par l'acide chlorogénique concerne spécifiquement l'AIA ; le diphénol n'exerce aucune action vis-à-vis de deux autres molécules auxiniques de nature synthétique, l'ANA ou le 2,4 D. De plus, en présence d'acide chlorogénique, les auteurs retrouvent des quantités plus importantes d'auxine dans le milieu, ce qui les amène à penser qu'in vivo le diphénol pourrait agir de la même manière en protégeant l'AIA.

Une action directe des phénols sur l'auxine endogène est démontrée chez Lens culinaris où les acides chlorogénique (PILET, 1964) et caféique (TAFURI et al., 1972) entraînent une élévation de la teneur en cette hormone dans les racines, tandis qu'au contraire l'acide p-hydroxybenzoïque appliqué à des sections de tige réduit la quantité d'auxine endogène et inhibe leur croissance.

TABLEAU II

Orthodiphénols et polyphénols : inhibiteurs du système AIA oxydase in vitro et agissant en synergie avec l'AIA dans différents tests de croissance

Composés phénoliques (par séries)	Origine de l'AIA oxydase dans le cas d'études sur l'enzyme in vitro	Nature du "test biologique"	Auteurs des travaux
Acides benzoïques			
Ac. protocatéchique	Racines de Lin, de Blé, Coléoptiles d'Avoine	Coléoptile d'Avoine	Aberg et Johansson (1969)
		Mésocotyle d'Avoine	Nitsch et Nitsch (1962)
	Peroxydase commerciale		Schaeffer et al. (1967)
Ac. gentisique	Coléoptiles d'Avoine	Mésocotyle d'Avoine	Tomaszewski (1964)
Acides cinnamiques			
Ac. caféique		Epicotyle de Pois	Andreae et Collet (1968)
		Mésocotyle d'Avoine	Henderson et Nitsch (1962)
	Coléoptiles d'Avoine		Zenk et Müller (1963)
		Coléoptile d'Avoine	Vendrig et Buffel (1961)
	Pois		Rabin et Klein (1957)
Ac. sinapique	Epicotyles de Pois	Epicotyle de Pois	Tomaszewski et Thimann (1966)
	Peroxydase commerciale		Schaeffer et al. (1967)
	Coléoptiles d'Avoine		Zenk et Müller (1963)
Ester d'acide cinnamique			
Ac. chlorogénique		Mésocotyle d'Avoine	Nitsch et Nitsch (1962)
	Racines de lentille		Pilet (1964)
	Pois		Rabin et Klein (1957)
	Coléoptiles d'Avoine	Hypocotyle de Tournesol	Tomaszewski (1964)
		Epicotyle de Pois	Tomaszewski et Thimann (1966)
	Coléoptiles d'Avoine		Zenk et Müller (1963)
	Peroxydase commerciale		Schaeffer et al. (1967)
Acide propionique			
Ac. dihydrocaféique	Coléoptiles d'Avoine		Zenk et Müller (1963)
Flavonoïdes			
Quercétine		Epicotyle de Pois	Andrea et Collet (1968)
Rutine	Pois		Munford et al. (1961)
		Mésocotyle d'Avoine	Nitsch et Nitsch (1962)
Catéchine	Coléoptiles d'Avoine		Tomaszewski (1964)
	Graines de Pêcher	Coléoptile d'Avoine	Ritzer et al. (1972)
Alcools cinnamyliques			
Alc. dihydroconifé-rylique	Hypocotyles de Concombre	Hypocotyle de Concombre	Sakurai et al. (1974)
Phénols simples			
Catéchol	Racines de Lentille		Gaspar et al. (1964)
		Mésocotyle d'Avoine	Nitsch et Nitsch (1962)

D'après PILET (1967), l'AIA oxydase contrôlerait l'état auxinique du végétal et les quantités d'AIA seraient finalement déterminées par la présence des effecteurs positifs ou négatifs de cette enzyme.

Parallèlement à ces études où l'action des phénols est appréciée in vitro sur des segments d'organes, différentstravaux réalisés in vivo ont permis d'aboutir aux mêmes conclusions. L'action de la lumière a souvent été retenue pour moduler la formation des composés phénoliques. Ainsi, ENGELSMA et MEYER (1965) montrent qu'une brève exposition de plants de Cornichon étiolés à la lumière rouge ou bleue,entraîne une réduction de taille qui s'accompagne d'une augmentation de la teneur en acide p-coumarique. Le composé, appliqué de manière exogène,ralentit l'allongement de l'hypocotyle à l'obscurité, alors qu'inversement les dérivés de l'acide férulique et certains flavonoïdes de cette plante "reversent" l'effet de l'acide p-coumarique et inhibent in vitro l'AIA oxydase.

Ces mêmes interactions peuvent être observées chez le Pois (HILLMAN et GALSTON, 1957 ; MUNFORD et al., 1961 ; GALSTON, 1969). Par l'intermédiaire du phytochrome, le facteur lumière intervient différemment dans chaque partie de la plante en contrôlant le mode d'hydroxylation des flavonoïdes : dans la région apicale,un éclairement dans le rouge lointain(BOTTOMLEY et al., 1966) favorise simultanément la croissance des bourgeons et la synthèse de glucosides de la quercétine (composés considérés comme des inibiteurs de l'AIA oxydase),tandis qu'au contraire,dans les tiges, ce traitement entraîne préférentiellement la formation plus importante de glucosides du kaempférol (cofacteurs de la destruction de l'AIA) et un ralentissement de croissance.

On voit ,dans l'ensemble,que de nombreux travaux ont été réalisés visant à démontrer des relations phénols - auxine dans les phénomènes de croissance et de développement. La plupart des auteurs, tout en distinguant l'action négative des monophénols ou positive des diphénols vis-à-vis de la croissance, s'accordent à attribuer à ces deux catégories de composés un rôle dans le contrôle de la dégradation de l'auxine. Toutefois, cette règle souffre de nombreuses exceptions qui sont mises en évidence par les résultats contradictoires enregistrés :

- ainsi, d'un point de vue qualitatif, le résorcinol et les acides α β σ résorcylique, composés diphénoliques,sont activateurs de l'AIA oxydase (MATO, 1970),

- un effet des quantités de phénols mises en jeu est également à considérer, aussi bien dans les tests d'élongation que vis-à-vis de l'activité AIA oxydase. Aux faibles concentrations les polyphénols

agissent, selon la règle générale, en renforçant l'action stimulante de l'auxine, mais l'inhibent pour des doses plus élevées (NITSCH et NITSCH, 1962). La remarque inverse est d'ailleurs valable dans le cas des interactions monophénols - AIA (TOMASZEWSKI, 1964). De même l'action exercée par la scopolétine vis-à-vis du système AIA oxydase dépend également des concentrations utilisées (IMBERT et WILSON, 1970).

- des résultats variables ont été enregistrés avec les mêmes composés phénoliques appliqués à différents systèmes biologiques. BARDINSKAJA et al. (1962) notent, par exemple, une accélération de la croissance du coléoptile de Blé sous l'action de l'acide férulique qui pourrait être reliée à un effet inhibiteur de l'activité AIA oxydase (SACHER, 1963 ; SCHAEFFER et al., 1967) ; inversement NITSCH et NITSCH (1962) démontrent au contraire que ce composé exerce une action inhibitrice sur l'allongement du mésocotyle d'avoine et GORTNER et al. (1958), ZENK et MULLER (1963) mettent en évidence un effet activateur vis-à-vis du système de dégradation de l'auxine. De même NITSCH et NITSCH (1962) ont trouvé que la quercétine et le kaempférol sont tous deux synergistes de l'AIA en augmentant la croissance du mésocotyle d'avoine, ce qui est en contradiction avec les résultats de MUNFORD et al. (1961) et ceux de FURUYA et al. (1962). Il est évident que ces distorsions peuvent être en particulier expliquées par les réponses spécifiques des systèmes et l'absence de normalisation des procédures expérimentalès ; elles nuisent cependant à la généralisation des hypothèses présentées.

- enfin, certaines observations ne sont pas en accord avec un rôle des phénols dans la modulation du catabolisme auxinique. Ainsi, les effets de synergie (NEUMAN, 1960 ; THIMANN et BONNER, 1949) ou d'antagonisme (BONNER et BANDURSKI, 1952) manifestés par la coumarine à l'égard de l'AIA ne semblent pas devoir être directement reliés au métabolisme de l'auxine (VARGA et KOVES, 1962). Par ailleurs et paradoxalement, alors qu'il exerce in vitro une activation du système AIA oxydase, l'acide p-hydroxybenzoïque à faible concentration stimule l'allongement de sections de tiges de Lens culinaris (PILET, 1966) ou du coléoptile d'Avoine (VIEITEZ et al., 1966), ce qui est contraire aux résultats escomptés. Enfin, l'acide caféique qui, associé à l'auxine, stimule la rhizogénèse de fragments de tubercules de Topinambour, ne paraît pas intervenir en tant qu'inhibiteur des auxines oxydases, mais probablement selon des modalités plus spécifiques (PAUPARDIN, 1969).

Il semble donc que si certains résultats apparaissent relativement convaincants de nombreux autres, concernant en particulier l'action in vitro des composés phénoliques sur l'activité AIA oxydase, sont plus difficilement transposables à la plante entière et parfois contradictoires. Dans ce type d'expérimentation, les composés testés ne sont pas toujours représentatifs tant sur le plan qualitatif que quantitatif du contenu phénolique du végétal ; mono et diphénols sont essentiellement représentés à l'état naturel sous forme de combinaisons (esters et glucosides) et exercent, par rapport aux aglycones correspondantes qui sont le plus souvent étudiées, des effets singulièrement différents sur l'activité AIA oxydase (KOSUGE, 1969). De plus, les proportions relatives des différents effecteurs (mono - diphénols) sont généralement mal appréciées au sein des tissus et leurs concentrations inconnues. Ces données, obtenues in vitro, apparaissent donc encore difficilement généralisables au végétal entier. Enfin, au-delà d'un contrôle auxinique par le biais de la dégradation, on peut envisager que les composés phénoliques interviennent selon des modalités différentes se rapportant soit spécifiquement à la synthèse de l'auxine (GORDON et PALEG, 1961), soit indirectement à des processus biochimiques plus généraux. C'est ce que nous allons examiner maintenant.

C - POLYPHENOLS ET PROCESSUS BIOCHIMIQUES ASSOCIES A LA CROISSANCE ET AU DEVELOPPEMENT

Parallèlement aux interactions phénols auxine par l'intermédiaire du système AIA oxydase, d'autres niveaux d'intervention des substances phénoliques ont été avancés pour expliquer leurs effets sur la croissance.

1.- Polyphénols et activités enzymatiques

De nombreux polyphénols ont la caractéristique de moduler, in vitro, les activités d'enzymes solubles ou membranaires ainsi que celles d'organites en se liant de différentes façons aux protéines. Une action inhibitrice des polyphénols a été relevée pour de nombreuses enzymes intervenant dans la respiration (KAJINAMI et al., 1971 ; Van SUMERE et al., 1972), la synthèse protéique (Van SUMERE et al., 1972), dans certaines phases de la germination (BRODA, 1966) mais aussi activatrice pour certains biocatalyseurs de la photorespiration (De JONG , 1973).

Par ailleurs, les composés phénoliques ont été impliqués en tant que cofacteurs dans différentes réactions enzymatiques faisant intervenir les peroxydases (dégradation de l'AIA, formation d'éthylène). Cependant, la transposition in vivo des résultats obtenus reste problématique compte tenu de la compartimentation subcellulaire des différents constituants. La modification de cette compartimentation lors des extractions conduit d'ailleurs à une inhibition très importante des enzymes, phénomène couramment observé (BOUDET et GADAL, 1965 ; LOOMIS et BATAILLE, 1966 ; ANDERSON et ROWAN, 1967).

2.- Composés phénoliques et métabolisme énergétique

Chacune des étapes de la croissance nécessite un apport continuel d'énergie indispensable à l'édification du matériel biochimique intervenant au cours de la division et de l'allongement cellulaire.

Les polyphénols peuvent interférer in vitro avec les processus générateurs d'énergie dans la cellule végétale :

- en se comportant dans la phosphorylation oxydative comme des agents découplants qui agiraient en diminuant la valeur du rapport P/O ; on peut citer l'acide cinnamique (MARINOS et HEMBERG, 1960), les coumarines (STENLID et SADDIK, 1962 ; MAYER et POLJAKOFF-MAYBER, 1963 ; DADAK, 1967), de nombreux flavonoïdes (STENLID, 1963, 1970), le catéchol et l'acide chlorogénique (LIEBERMAN et BIALE, 1956).

- en inhibant dans les chloroplastes la phase de photophosphorylation ; c'est le cas du kaempférol avec les chloroplastes isolés de feuilles de Spinacia oleracea (SCHNEIDER, 1973) ou de Pois (ARNTZEN et al., 1974), de l'isovitexine et d'autres C-glucosylflavones en présence de chloroplastes d'Avoine (WEISSENBÖCK et SCHNEIDER, 1974).

Au cours de ces interactions, l'effet des polyphénols se traduirait par une diminution de la production d'ATP (STENLID, 1970), mais aussi au cours de la phase de photophosphorylation non cyclique par un ralentissement de la synthèse de $NADPH_2$ (SCHNEIDER, 1971).

Des observations convergentes ont pu être réalisées, in vivo, en étudiant l'action de certains phénols sur des processus physiologiques nécessitant un apport énergétique. Par exemple, le mouvement de vrilles de Pois qui est sous la dépendance d'une ATPase cellulaire peut être inhibé par des traitements avec des flavonoïdes comme la quercétine (GALSTON, 1969). De même, chez l'Avoine, les déplacements cytoplasmiques observés dans les poils absorbants de la racine sont ralentis en présence d'aglycones flavoniques (POPOVICI et REZNICK, 1976) ce

qui est interprété par les auteurs comme un effet sur la formation d'ATP.

Cependant, malgré les différents arguments présentés, les relations de cause à effet avec les processus de croissance n'apparaissent pas toujours évidents. Ainsi les acides férulique, p-coumarique, la coumarine et l'esculétine qui pourtant affectent la croissance des cellules de Levure ne manifestent aucun effet vis-à-vis de la phosphorylation oxydative des mitochondries ; à l'inverse l'acide caféique agirait sur ce processus sans modifier la croissance des Levures (Van SUMERE et al., 1972). De même chez le Haricot, les acides férulique, caféique, p-hydroxybenzoïque et syringique déterminent une réduction importante de l'allongement de l'hypocotyle mais ne modifient aucun des processus énergétiques des mitochondries (DEMOS et al., 1975). Il apparaît donc que si l'action de certains polyphénols résulte de modifications du métabolisme énergétique, on ne peut étendre cette règle à tous les composés.

3.- Polyphénols et potentiel d'oxydoréduction

L'équilibre d'oxydoréduction de la cellule végétale a souvent été associé aux différentes phases, croissance, développement, sénescence, qui caractérisent la vie de la plante (Van FLEET, 1954 ; SIEGEL et PORTO, 1961). Il tend à varier d'un état réduit, pendant la période juvénile, vers un état oxydé qui s'installe à la sénescence. Son ajustement dans la cellule serait sous la dépendance étroite de l'élaboration, par celle-ci, d'effecteurs tels l'acide ascorbique, l'hydroquinone, de composés à groupement SH (BETZ, 1963 ; PILET et ZRYD, 1965) qui permettraient en début de croissance le maintien à l'état réduit. La part revenant aux polyphénols dans le déterminisme de ce potentiel d'oxydoréduction reste hypothétique. Van FLEET (1954) considère que les quinones, obtenues in vivo par oxydation de certains polyphénols, interviendraient de manière déterminante dans le passage de la phase juvénile à la phase de maturité puis à la sénescence. Dans sa théorie sur les protecteurs d'auxine (Prs) STONIER (1972) attribue un rôle d'antioxydant à des substances à fonction dihydroxyphénolique, de poids moléculaire élevé, qui seraient capables in vitro d'inhiber de nombreuses oxydations catalysées par les peroxydases : oxydation de l'AIA, du glutathion, du NADH, polymérisation des monomères des lignines (STONIER et YANG, 1972, 1973). Selon STONIER la présence de quantités importantes de Prs dans la cellule favoriserait la division cellulaire alors que la différenciation serait associée à une diminution des Prs (avec un changement vers l'état oxydé).

4.- Intervention particulière de produits d'oxydation des phénols

Les quinones, produits d'oxydation des phénols, sont considérées comme des substances possédant un potentiel physiologique important. Elles interfèrent dans la respiration et la phosphorylation oxydative en piégeant les électrons issus des chaînes respiratoires (Van SUMERE et al., 1972). Un certain nombre d'enzymes peuvent être inhibées par les quinones, car ces composés sont capables de se combiner avec les groupements thiols ou aminés des protéines (PIERPOINT, 1970). C'est le cas par exemple de la phosphorylase de la Pomme de terre étudiée par BLANK et SONDHEIMER (1969) qui mettent en évidence le rôle de l'acide chlorogénique via ses produits d'oxydation.

Les quinones semblent également intervenir dans le développement en agissant au cours de la division cellulaire en tant qu'inhibiteurs de mitoses (Van FLEET, 1954 ; REED, 1959) et en favorisant plus particulièrement certaines étapes de différenciation comme dans le cas de faisceaux vasculaires isolés de Céleri où elles accélèrent l'oxydation de l'eugénol en produits de type lignine (SIEGEL et al., 1960). Enfin, l'inhibition de la germination des graines résiderait essentiellement en un piégeage de l'oxygène moléculaire par des composés phénoliques qui seraient transformés en quinones (COME, 1967 ; MARBACH et MAYER, 1974, 1975).

5.- Polyphénols et modification de la perméabilité membranaire

Au-delà des mécanismes proposés pour expliquer le rôle éventuellement joué par les polyphénols dans la physiologie intime de la plante, d'autres modalités d'action ont été avancées concernant l'effet particulier que ces composés exercent dans les phénomènes d'allélopathie. Ainsi, dans une série de travaux récents GLASS (1973, 1974 a, 1974 b) montre que les acides phénoliques des séries benzoïque et cinnamique ralentissent l'absorption d'ions (phosphore - potassium) par des racines d'Orge excisées. Le pouvoir inhibiteur manifesté par ces composés varie corrélativement avec leur solubilité dans les solvants lipidiques, ce qui suggère une action directe au niveau de la perméabilité membranaire.

6.- Polyphénols et paroi

Dans la plupart des théories avancées pour justifier l'intervention des composés phénoliques dans la croissance, le rôle actif est principalement attribué aux unités simples. Or, chez les végétaux supérieurs, ces dernières sont à l'origine de la lignine, polymère de nature phénolique qui assure aux organes végétaux la rigidité nécessaire à l'établissement d'un port dressé. A l'heure actuelle le déter-

minisme et le contrôle de la lignification sont mal appréciés, mais on sait que cette phase,qui représente un phénomène typique de différenciation,se déroule à la suite de l'arrêt de la croissance de la cellule (SARKANEN et LUDWIG, 1971).

WARDROP fut le premier en 1964 à formuler une hypothèse tendant à associer l'arrêt de l'allongement cellulaire avec la mise en place de ce polymère dans les parois : d'après cet auteur,le déclenchement précoce de ce processus pourrait limiter l'expansion cellulaire par simple immobilisation de la matrice pariétale. Ce thème a par la suite été développé par la recherche de corrélations entre les deux évènements. Ainsi, SIEGEL (1956) observe par exemple que la lignification est moins intense dans le cas de plants étiolés. A l'inverse, des traitements par l'auxine qui accélèrent la croissance inhibent la lignification (STAFFORD, 1967) alors que pour des concentrations hyperphysiologiques, cette hormone stimule au contraire ce processus (SARKANEN et LÜDWIG, 1971). De même l'hydroxyproline et l'éthylène inhibent l'élongation du coléoptile de Blé et déterminent une augmentation du contenu en lignine, tandis que le dipyridyl manifeste les effets opposés (WHITMORE, 1971).

Enfin, à côté de ce rôle éventuel des lignines "classiques", il faut signaler la caractérisation plus récente d'une fixation, sur des polysaccharides, d'unités phénylpropénoïdes (HARTLEY et JONES, 1976 ; WHITMORE, 1976) qui pourraient également intervenir dans le renforcement de la paroi cellulaire.

D - CONCLUSION

A partir de cette étude bibliographique, on peut donc constater que, malgré une grande quantité d'informations, les fonctions physiologiques des composés phénoliques au sein des végétaux demeurent encore très imprécises.

Divers travaux tendent à leur attribuer un rôle dans la croissance et le développement. Les arguments sont de deux sortes : tout d'abord des corrélations *in vivo* entre la formation de polyphénols particuliers et des réponses morphogénétiques précises. Cependant, il faut bien admettre que si ces observations représentent des éléments en faveur de leur intervention virtuelle, elles ne permettent pas de dégager de manière irréfutable des relations de cause à effet.

La deuxième série d'arguments découle d'expériences réalisées *in vitro* après apport exogène de substances phénoliques à des organes excisés en survie ou des tissus en culture . Ces études apparaissent critiquables pour plusieurs raisons :

- d'une part les composés ne sont pas toujours ni sous leur forme naturelle (cas des aglycones), ni normalement présents dans le matériel végétal utilisé,

- d'autre part, avant d'agir en tant que tels, ces derniers sont susceptibles de subir dans les milieux d'incubation des transformations donnant naissance à des produits de dégradation (quinones par exemple) souvent plus toxiques que les phénols correspondants (Mac CLURE, 1975),

- enfin, les composés phénoliques sont souvent apportés à des concentrations très largement supérieures à celles des tissus étudiés (KEFELI et KADYROV, 1971).

Selon ce type d'approche, les substances peuvent atteindre des sites métaboliques différents de ceux concernés dans les conditions naturelles. Le problème de la compartimentation cellulaire à l'origine de "pools" phénoliques physiologiquement actifs ou non apparaît en effet crucial dans ce contexte.

En ce qui concerne les modalités d'action impliquant les phénols dans différents phénomènes physiologiques, les directions de recherches se révèlent nombreuses mais rien n'est encore établi de façon définitive : agissent-ils par le biais d'interactions avec les phytohormones ? Se comportent-ils comme des régulateurs de certains processus biochimiques en interférant par exemple dans la production d'énergie et en tant qu'intermédiaires des phénomènes d'oxydo réduction ? Ou interviennent-ils seulement comme constituants des parois ? De plus, excepté le cas de l'AIA oxydase qui constitue un exemple typique de leur mode d'intervention en tant qu'effecteurs, aucune étude n'a été réalisée au niveau moléculaire.

C'est donc une impression de très grande complexité qui ressort de cette analyse bibliographique, complexité inhérente au problème étudié et que l'on retrouve pour d'autres phénomènes "fondamentaux" du développement, dominance apicale, floraison..., mais complexité résultant également de la diversité des polyphénols, de l'hétérogénéité des systèmes d'expérimentations et des approches retenues.

Un problème majeur souvent évoqué réside dans la difficile transposition des résultats obtenus <u>in vitro</u> au fonctionnement <u>in vivo</u>. En tenant compte de l'ensemble des travaux précédents et de leur étude critique j'ai envisagé une approche nouvelle du rôle éventuel des polyphénols dans la croissance des végétaux.

PREMIERE PARTIE

ETUDE DES EFFETS DES POLYPHENOLS SUR LA CROISSANCE CHEZ *Lycopersicum esculentum*

CHAPITRE I

REPERCUSSIONS D'UNE STIMULATION DU CONTENU PHENOLIQUE SUR LA CROISSANCE DE PLANTS DE TOMATE

CHAPITRE II

RECHERCHES PRELIMINAIRES SUR LES MODALITES D'ACTION DES COMPOSES PHENOLIQUES DANS LES MODIFICATIONS DE CROISSANCE

CHAPITRE III

MISE EN EVIDENCE D'UNE SITUATION HYPERAUXINIQUE CHEZ DES PLANTS DE TOMATE TRAITES PAR DES PRECURSEURS DU METABOLISME PHENOLIQUE

CHAPITRE I

REPERCUSSIONS D'UNE STIMULATION DU CONTENU PHENOLIQUE SUR LA CROISSANCE DE PLANTS DE TOMATE

A - MATERIEL ET METHODES

1.- Matériel végétal

a - Conditions de culture "standard"

Les déterminations effectuées dans ce travail concernent des plants de Tomate (Lycopersicum esculentum Mill., variété Saint-Pierre) dicotylédone de la famille des Solanacées.

Les semences, d'origine commerciale "le PAYSAN", sont mises à imbiber 14 heures dans l'eau distillée à 20° C, puis enfouies dans du sable à 1 cm de profondeur. Le support sableux (8 cm d'épaisseur) préalablement lavé et stérilisé au four Pasteur à 185° C, est contenu dans des bacs de matière plastique. Chaque bac, perforé à la base, est alors plongé 5 heures par jour dans 500 ml de milieu nutritif de HOAGLAND et ARNON formule C 1 (CHOUARD, 1952) contenu dans des bacs de dimensions supérieures aux précédents. En dehors de cette période les bacs contenant les plants sont maintenus hors du milieu, la solution nutritive en excès s'égouttant dans les récipients d'immersion. Les plants sont cultivés à la température constante de 22° C $\pm$ 1 pour un éclairement de 10 000 lux (tubes fluorescents PHILIPS, TL 65 watts, Lumière du Jour de luxe) et une héméropériode de 14 h ; l'humidité varie entre 60 et 80 % de la saturation.

Dans de telles conditions, la levée des plants s'effectue après 5 à 6 jours. Le traitement par les précurseurs du métabolisme phénolique est effectué après le 12e jour, stade d'apparition des 3e et 4e feuilles (au-dessus des feuilles cotylédonaires).

b - Culture en présence de différentes molécules organiques

On se propose ici d'apporter, dans des conditions normales de culture, au niveau du système radiculaire, différents composés précurseurs ou non des polyphénols. Leur adjonction directe dans le milieu nutritif s'est avérée impossible en raison de phénomènes de précipitation : les composés organiques ont donc été fournis séparément en solution dans l'eau avec éventuellement une rectification du

pH à 5,5 par addition de K_2CO_3. Douze jours après la mise en culture, consécutivement à l'immersion dans le milieu minéral, les bacs sont plongés quotidiennement pendant 4 heures dans la solution des composés à tester. Pour réduire les interactions entre la solution organique et le milieu nutritif minéral, le support sableux est rincé dans un premier temps par arrosage avec de l'eau distillée, puis par la solution à utiliser. Les différents milieux sont renouvelés tous les 4 jours afin d'éviter à long terme de possibles contaminations bactériennes.

2.- Méthodes de dosage des composés phénoliques

Différentes méthodes existent actuellement pour estimer globalement l'ensemble des composés phénoliques des végétaux (SWAIN et HILLIS, 1959) ou plus particulièrement certaines catégories de polyphénols : leucoanthocyanes, catéchines, anthocyanes (CREASY et SWAIN, 1966), flavonols (LEBRETON et al., 1967). Cependant, ces déterminations réalisées par spectrophotométrie ou colorimétrie sur des extraits relativement complexes manquent de spécificité (MACHEIX, 1968). Pour suivre les variations des composés phénoliques totaux, j'ai retenu une méthode de purification faisant intervenir le POLYCLAR* adsorbant spécifique des polyphénols déjà utilisé par ANDERSEN et SOWERS (1968).

a - Extraction des composés phénoliques

En raison de la sensibilité des méthodes de dosage, les déterminations ne nécessitent que de faibles quantités de matériel végétal de départ (100 à 200 mg de matériel végétal sec suffisent). L'extraction est réalisée en continu (ALIBERT et al., 1969) par l'éthanol à 80° GL. L'extrait évaporé à sec sous vide est dépigmenté par l'éther de pétrole (35-50° C) puis l'éther lavé par de petites quantités d'H_2O avec lesquelles on reprend le résidu d'évaporation.

b - Purification des composés phénoliques : utilisation du Polyclar

L'étude des conditions optimales d'adsorption des phénols sur Polyclar, effectuée en utilisant différents mélanges de composés les plus répandus chez les végétaux (MARIGO, 1973) a permis d'établir

---

* L'adsorbant (POLYCLAR AT, General Anilin & Film Corp) est traité 10 minutes à 100° C par HCl à 10 %, rincé successivement par l'eau distillée et l'acétone, puis séché sous vide avant l'emploi.

le protocole suivant : une fraction de l'extrait aqueux précédent (généralement 20 ml) est amenée à pH 3,5 puis introduite dans des béchers de 50 ml en présence de Polyclar en excès (MARIGO, 1973), soit 1 g de Polyclar pour 100 mg de matériel végétal sec. Les béchers sont placés sur un plateau oscillant sous agitation (100 cycles/mn) pendant 10 minutes. Après filtration et rinçage du Polyclar par H_2O (20 ml), les substances non phénoliques sont recueillies dans le filtrat et les polyphénols demeurent fixés sur l'adsorbant.

c - Estimation des phénols totaux

Le dosage des composés phénoliques considérés globalement est effectué en utilisant le réactif de Folin et Ciocalteu (mesure du pouvoir réducteur) selon la méthode de SWAIN et HILLIS (1959) modifiée au laboratoire (MARIGO, 1973). L'intensité de la coloration apparue est estimée à 760 nm en utilisant un Spectrophotomètre Beckman modèle DU. Afin d'éliminer les interférences dues à certaines substances réductrices non phénoliques pouvant réagir avec le réactif de Folin (MACHEIX, 1968), les polyphénols sont préalablement purifiés par fixation sur Polyclar. L'estimation de leur teneur est réalisée après détermination du pouvoir réducteur, par différence avant et après traitement par le Polyclar. Les résultats sont exprimés en µMoles d'acide chlorogénique en faisant référence à une droite étalon obtenue avec ce composé.

d - Dosage de l'acide quinique libre et de ses depsides

Après passage sur Polyclar, l'acide quinique présent à l'état libre n'est pas retenu (MARIGO, 1973) et peut être dosé quantitativement dans le filtrat selon la méthode colorimétrique de MESNARD et DEVAUX (1963). Le dosage de l'acide quinique lié sous forme d'ester (type chlorogénique par exemple) s'effectue suivant la même technique, mais après hydrolyse directe des esters quinique fixés sur Polyclar par la baryte 0,05 N pendant 15 minutes à 100° C. Les déterminations d'acide quinique selon ce protocole permettent d'évaluer globalement l'importance des depsides "cinnamoyl quinique" du végétal.

3.- Appréciation de la croissance des plants de Tomate

a - Mesure de la croissance

La croissance des plantules de Lycopersicum est appréciée en retenant comme critère l'évolution en fonction du temps de la masse de matériel frais ou sec, ainsi que la détermination de la hauteur des parties aériennes. Dans chaque cas, sont présentées des valeurs moyennes obtenues à partir de lots de 16 individus.

b - Estimation du nombre de cellules par dosage de l'ADN

Pour caractériser l'effet du traitement sur la division cellulaire, on détermine les quantités d'acide désoxyribonucléique par la méthode colorimétrique de BURTON (1956). Celle-ci repose sur le dosage, par action de la diphénylamine, du désoxyribose libéré par hydrolyse acide (acide perchlorique 1 N, 20 minutesà 70° C) ; l'ADN est au préalable purifié selon le procédé de CHERRY (1962), après différents épuisements du matériel végétal, destinés à éliminer tour à tour les phosphates solubles (extraction par le méthanol et l'acide perchlorique 0,2 M à froid), les lipides (éthanol - mélange éthanol, éther : 2-1) enfin les acides ribonucléiques (hydrolyse par NaOH 0,3 N, 18 heures à 37° C).

B - MODALITES DE STIMULATION DU POOL PHENOLIQUE

Le contenu phénolique des plantes peut varier de façon importante en réponse à différents traitements (modifications de l'intensité lumineuse, carences) et "stress" physiologiques de toutes natures (blessures, infections parasitaires, chocs hydriques et nutritionnels). Cependant, un moyen parfaitement contrôlable et modulable à volonté m'a paru consister en l'apport à la plante de précurseurs du métabolisme phénolique.

1.- Choix du précurseur

Des stimulations de la teneur en phénols ont déjà été observées selon cette approche, lors d'expériences visant à préciser des relations biogénétiques entre précurseurs et produits (ZUCKER, 1963 ; ENGELSMA, 1965 ; STAFFORD, 1965 ; CREASY, 1968) ou à accroître la résistance des plantes aux infections parasitaires (FELDMAN et HANKS, 1970). Le saccharose, la phénylalanine ou différents acides phénoliques étaient alors fournis à des disques de feuilles ou des organes isolés.

Pour répondre aux critiques formulées à l'emploi d'organes excisés, j'ai préféré m'adresser à des plants entiers en fournissant le précurseur au niveau des racines (MARIGO et BOUDET, 1975). Parmi les substances susceptibles de jouer ce rôle, l'acide quinique a retenu mon attention ; de répartition assez générale, ce composé est un intermédiaire dans la synthèse du noyau aromatique, s'accumulant de façon importante chez les végétaux tout en subissant un renouvellement rapide (BOUDET, 1972). De plus, chez Lycopersicum esculentum, matériel retenu dans cette étude, il est présent sous forme libre et combinée (FUCHS et De VRIES, 1968).

En tant que précurseur, ce composé paraissait offrir la garantie de ne pas manifester par lui-même d'effet phytotoxique, et pouvait

constituer une source carbonée utilisable par le végétal. Sur un plan plus purement pratique, disponible commercialement et relativement peu onéreux, il se prêtait à des essais nombreux et répétés.

2.- Contrôle de l'absorption de l'acide quinique au cours du traitement

L'apport du précurseur étant réalisé au niveau du système radiculaire de plants intacts, il convenait de vérifier tout d'abord que ce composé organique était effectivement absorbé par le végétal. J'ai tenté de préciser ce point de deux manières différentes :

- en suivant, pour des traitements de courte durée, l'incorporation d'acide quinique radioactif,
- en comparant, pour des traitements plus longs, les quantités d'acide quinique présentes dans les parties aériennes de plants témoins et traités.

. Mesure de l'absorption d'acide quinique radioactif

L'acide quinique radioactif uniformément marqué a été préparé par voie biologique (BOUDET, 1968). Les résultats de la figure 2 concernant l'incorporation du traceur radioactif démontrent la pénétration de l'acide quinique.

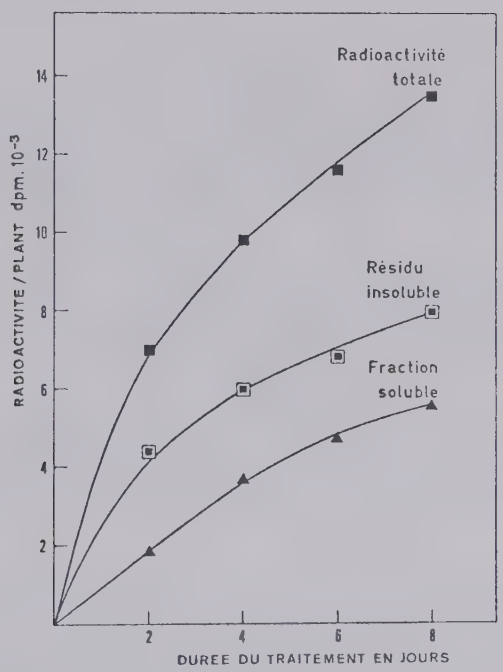


Figure 2 - Vérification de l'absorption de l'acide quinique ^{14}C et appréciation de son utilisation. Pour éviter une dilution de la radioactivité au cours des traitements, les plants sont dans cette expérience uniquement immergés pendant 4 h chaque jour dans la solution du précurseur (12,5 µCi/mol) à la concentration 4×10^{-2} M. L'incorporation est appréciée en recherchant la radioactivité sur une fraction soluble dans l'éthanol à 80° GL ainsi que sur le résidu insoluble mis en suspension dans NaOH 5 N. La radioactivité totale correspond à la somme des deux valeurs précédentes.

Il est à noter que la quantité d'acide absorbé par plant ne représente cependant au 8e jour qu'environ 1 % de l'apport initial (soit sensiblement 5 mg d'acide quinique dans les conditions retenues). Par ailleurs, une fraction importante de la radioactivité se retrouve très tôt dans le résidu insoluble ; dès le deuxième jour de traitement, elle avoisine près de 2/3 de la radioactivité totale incorporée. Cette observation, qui se rapproche des résultats obtenus chez Quercus pedunculata par BOUDET (1972), tend à prouver la rapide utilisation du précurseur vraisemblablement en direction des lignines (FUCHS et De VRIES, 1968).

• Comparaison des quantités d'acide quinique par plant

Au-delà de 8 jours, lorsque le végétal n'est pas approvisionné en solution minérale, des chloroses apparaissent au niveau des feuilles. Pour vérifier la pénétration de l'acide quinique pour des traitements de plus longue durée au cours desquels ce composé est apporté consécutivement à la solution minérale (cf. Conditions de culture page 28), j'ai donc estimé les quantités d'acide quinique dans les parties aériennes de plants témoins ou traités (Figure 3).

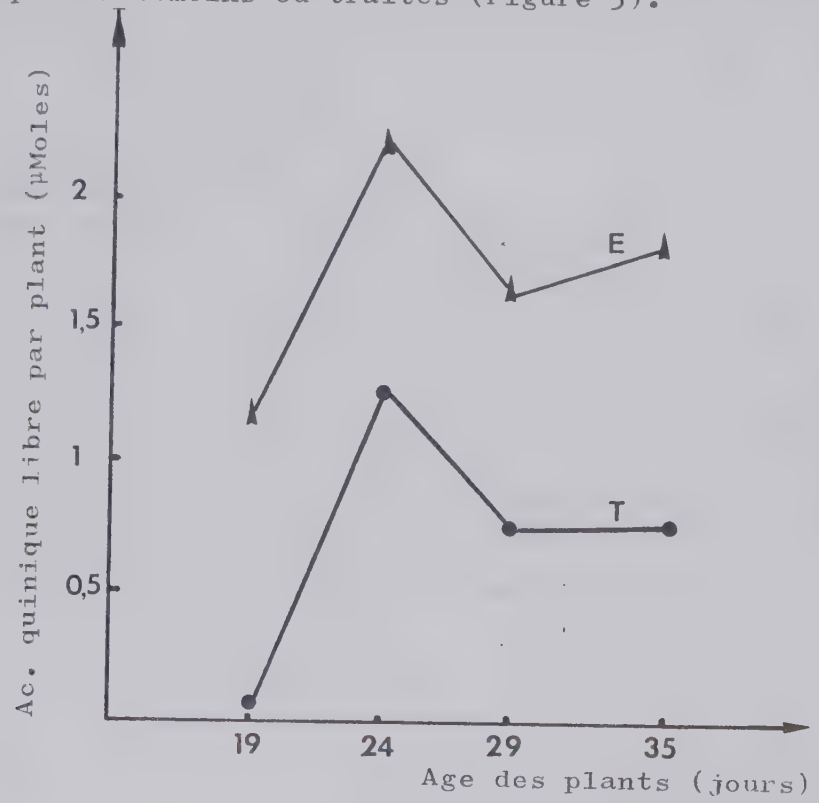


Figure 3- Evolution des quantités d'acide quinique par plant cultivé dans les conditions normales (T) ou après apport d'acide quinique 4×10^{-2} M (E). Le traitement débute 12 jours après la mise en culture et se poursuit pendant 22 jours.

A tout moment celles-ci sont largement supérieures dans le cas des individus ayant subi le traitement ; on peut donc affirmer que le précurseur est non seulement absorbé par le système radiculaire des plants de Tomate mais également transporté au niveau des parties aériennes.

Il est à noter, en fonction de l'âge des plants et de la durée du traitement, l'évolution parallèle des quantités d'acide quinique aussi bien pour les lots témoins que traités. Après absorption, le composé ne semble pas se comporter comme une forme de stockage physiologiquement inerte, mais bien au contraire être utilisé de la même manière que la forme endogène du végétal.

3.- Modifications quantitatives et qualitatives du pool phénolique

A la suite de l'apport en acide quinique, on constate au niveau des parties aériennes de plants de Tomate :

- une augmentation des teneurs en composés phénoliques solubles (Tableau III) dont le "pool" global est sensiblement multiplié par un facteur deux pour des déterminations réalisées entre 7 et 17 jours de traitement.

TABLEAU III

Déterminations des teneurs en composés phénoliques solubles dans les parties aériennes de plants témoins (T) et traités par l'acide quinique 4×10^{-2} M (E). Les résultats sont exprimés en µMoles d'acide chlorogénique par g de matériel végétal sec

	Nombre de jours de traitement				
	3	7	12	17	23
T	2	2,5	4	4	3,6
E	3,5	5,7	9,5	8	6,25

- l'apparition, dès le cinquième jour de traitement, de nouvelles cellules lignifiées au niveau des hypocotyles des plants traités qui déterminent un épaississement des faisceaux libéro-ligneux (Photo 1, page 34).

J'ai déterminé la composition qualitative des extraits phénoliques issus de plants témoins ou traités par l'acide quinique (4×10^{-2} M) par chromatographie bidimensionnelle, selon la technique d'identification retenue par TRONCHET (1969). L'examen des chromatogrammes (Figure 4) révèle la présence dans les témoins de 7 composés majeurs

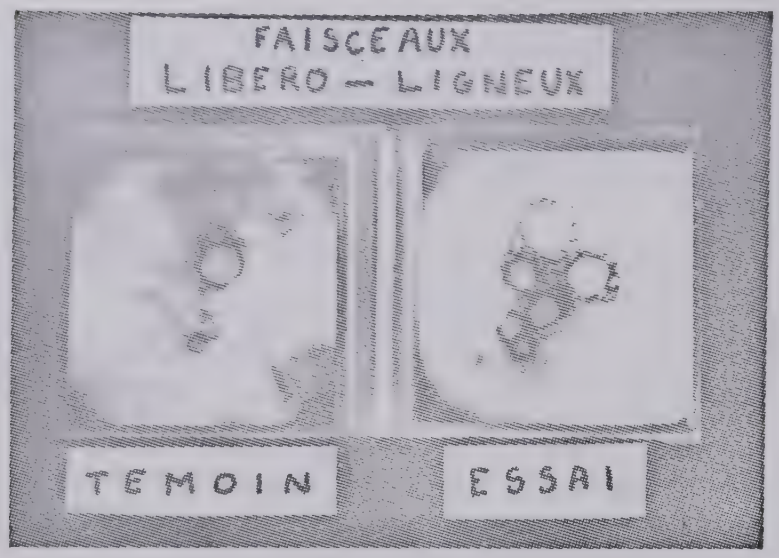


Photo 1

Faisceaux libéroligneux de plants témoins et traités par l'acide quinique (4 x 10^{-2} M). Colorations au carmin aluné-vert d'iode de coupes transversales effectuées au niveau de l'hypocotyle.

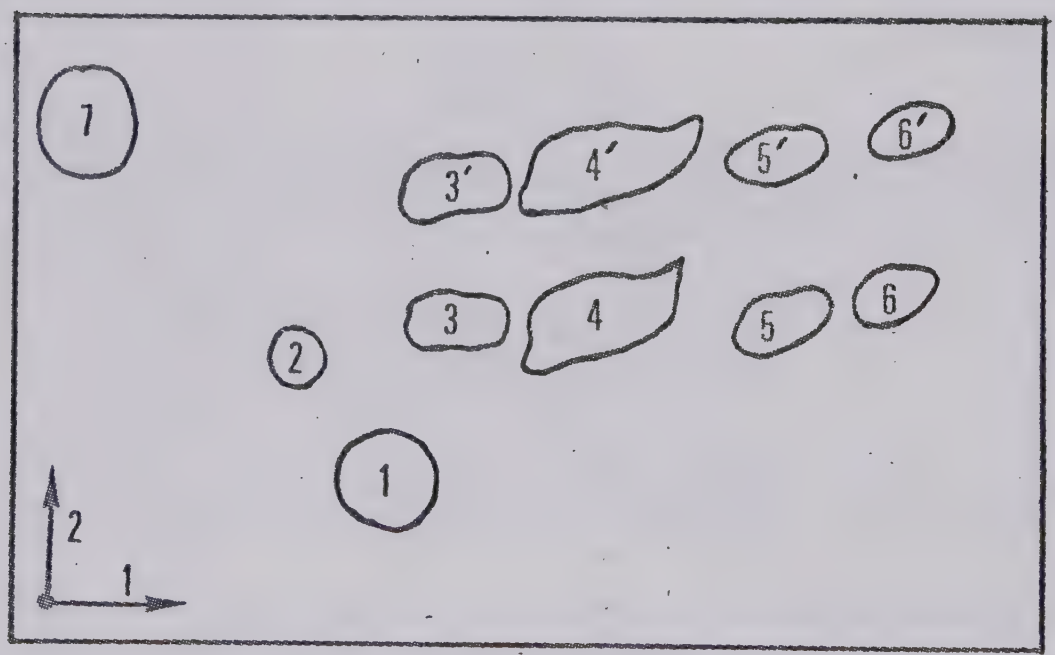


Figure 4 - Chromatogramme des polyphénols extraits à partir de plants de Tomate (selon la technique de TRONCHET, 1969).
1ère dimension : B.A.E. : butanol - acide acétique - eau (6-1-2 V/V)
2ème dimension : A.A. : acide acétique à 2 %
Les composés sont repérés en lumière ultra violette en présence ou non de vapeurs d'ammoniaque et par révélation à la p-nitraniline diazotée (SWAIN, 1953).

1 : rutine ; 2 : quercétine rhamnodiglucoside ; 3 et 3' : acide néochlorogénique ; 4 et 4' : acide chlorogénique ; 5 et 5' : acide féruloylquinique ; 6 et 6' : acide p-coumaroylquinique ; 7 : complexe d'esters caféique et d'esculétine. Les dédoublements des composés 3, 4, 5 et 6 correspondent aux isomères cis et trans.

qui apparaissent tous en quantités nettement plus importantes après apport d'acide quinique.

La comparaison des Rf, ainsi que l'étude des spectres d'absorption dans l'U.V. ont permis d'identifier les acides chlorogénique et la rutine prépondérants chez la Tomate, ainsi que différents depsides de l'acide quinique (p-coumaroylquinique, féruloylquinique).

Sur le plan qualitatif, dans la limite de la sensibilité de détection des réactifs utilisés, il n'existe pas de différence dans la nature des composés identifiés entre plants témoins et traités. L'apport d'acide quinique entraîne donc seulement une stimulation des teneurs en composés phénoliques naturellement présents, mais non l'apparition de nouvelles substances phénoliques.

4.- Mode d'utilisation de l'acide quinique dans la synthèse des composés phénoliques

Actuellement, il est clairement démontré que l'acide quinique participe activement à l'élaboration des structures phénoliques simples (BOUDET, 1972) ou plus complexes (FUCHS et De VRIES, 1968). A côté de ce rôle de précurseur direct, il entre également dans la constitution des depsides par condensation d'un de ses groupements hydroxyles avec le radical carboxyle d'un acide phénolique. Si ces différents aspects sont globalement connus, le métabolisme de ces composés présente cependant, en fonction des espèces, certaines particularités : chez Coffea, l'acide quinique seulement détectable à l'état de traces est entièrement mobilisé dans l'édification de l'acide chlorogénique (COLONNA et BOUDET, 1971) ; à l'inverse, le Chêne accumule l'acide alicyclique sans qu'il soit possible de mettre en évidence la présence de depsides (BOUDET, 1972).

En fonction de ces données, j'ai tenté de préciser chez Lycopersicum esculentum Mill. les principales voies d'utilisation de l'acide quinique au cours du traitement (MARIGO et al., 1975).

. Variations quantitatives des formes libres et liées de l'acide quinique au cours du traitement

Chez la Tomate dans les conditions normales (T), l'acide quinique existe à la fois libre et sous forme d'esters (Tableau IV, page 36) représentés essentiellement par des isomères de l'acide chlorogénique. Cependant, dans ce dernier cas, les teneurs apparaissent toujours très nettement supérieures à celles de l'acide alicyclique libre (2 à 10 fois suivant les stades) ; l'acide shikimique existe en faible quantité.

TABLEAU IV

Répercussions biochimiques engendrées dans les parties aériennes après l'apport d'acide quinique. Les résultats sont exprimés en mg d'acides alicycliques par g de matériel végétal sec

Age des plants en jours	Nbre de jours de traitement	Ac. quinique libre		Ac. quinique combiné		Ac. shikimique libre	
		T	E	T	E	T	E
19	7	0,19	4,81	0,91	1,89	0,024	0,116
24	12	0,95	3,64	1,43	4,8	0,024	0,070
29	17	0,25	1,70	2,53	3,71	0,023	0,065
35	23	0,14	1,0	0,88	1,58	0,020	0,068

T : plants témoins

E : plants traités par l'acide quinique (4×10^{-2} M)

L'apport d'acide quinique entraîne évidemment une augmentation du contenu en acide quinique libre mais également des teneurs en acide shikimique* du végétal (Tableau IV). Ce résultat, qui est à rapprocher des observations relevées après incorporation d'acide quinique inerte (MINAMIKAWA et YOSHIDA, 1972) ou radioactif (BOUDET, 1972) plaide en faveur de l'intégration de cet acide dans la voie de l'acide shikimique et, par conséquent, de son utilisation dans la synthèse des unités aromatiques chez la Tomate.

En valeur absolue, la stimulation la plus importante se retrouve au niveau des formes combinées de l'acide quinique (Tableau IV) dont les teneurs passent au 12e jour de traitement par un maximum. En ce qui concerne l'évolution de l'acide quinique libre au cours du traitement on constate que les teneurs, bien que très largement supérieures à celles des témoins, diminuent progressivement (Figure 5) ; ce fait résulte en partie de l'augmentation concomitante des depsides . L'acide quinique absorbé semble donc mobilisé pour une large part dans l'édification des depsides, résultat également relevé lors d'une expérience comparable sur des disques de Pomme de terre par ZUCKER et LEVY (1959).

* L'acide shikimique est dosé selon la méthode de GAITONDE et GORDON (1964) modifiée au laboratoire (BOUDET et al., 1967).

Les depsides ne se comportent pas seulement comme des produits d'accumulation dont le rôle se limiterait à une simple prise en charge de l'acide quinique absorbé. En effet, malgré une importante stimulation initiale on assiste, sur une courte période, à une diminution des teneurs (Figure 5) et des quantités de depsides par plant. Le problème se posait de rechercher le devenir des molécules ainsi utilisées.

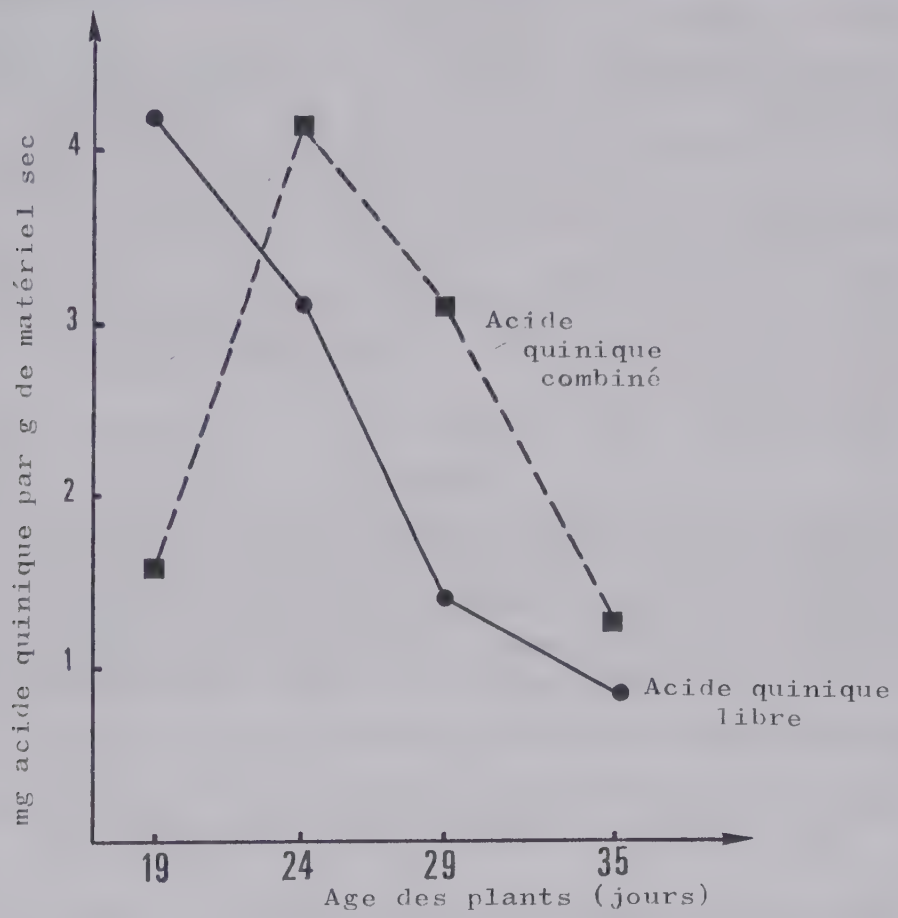


Figure 5 - Evolution des teneurs en acide quinique libre et combiné chez des plants de Tomate traités par apport exogène d'acide quinique 4×10^{-2} M (le traitement débute 12 jours après la mise en culture).

Deux éléments m'ont incité à rechercher leur éventuelle participation à la synthèse des lignines :

- d'une part, les données obtenues sur l'existence de cette transformation chez Xanthium (ZUCKER et LEVY, 1959),

- d'autre part, l'intégration importante de la radioactivité de l'acide quinique dans le résidu insoluble au cours du traitement (Figure2, page 31).

. Etude du devenir des formes combinées et en particulier de l'acide chlorogénique

Je me suis intéressé plus particulièrement au devenir métabolique de l'acide chlorogénique, car, conformément aux données de la littérature (SPURR et al., 1965) et en utilisant la technique d'identification par chromatographie bidimensionnelle (TRONCHET, 1969), j'ai vérifié que ce composé est largement prédominant par rapport aux autres depsides chez la Tomate.

Les déterminations effectuées après apport d'acide chlorogénique ^{14}C marqué sur la partie aromatique (préparé par voie biologique au laboratoire en fournissant de la phénylalanine U^{14}C à des plants de Tomate), montrent que très tôt (6 h de métabolisation), les aldéhydes provenant de l'oxydation des lignines* se retrouvent marqués ; l'incorporation du ^{14}C dans cette fraction augmente par la suite en fonction du temps. Sur un plan qualitatif ces résultats démontrent l'intervention de l'acide chlorogénique dans la synthèse de ces polymères (Tableau V).

TABLEAU V

Incorporation du ^{14}C de l'acide chlorogénique dans les lignines*. Le composé radioactif est apporté en déposant 20 µl de solution alcoolique à l'apex de plants entiers de Tomate. Les expériences sont effectuées sur des individus âgés de 12 et 24 jours, qui diffèrent par leurs teneurs en depsides. La radioactivité totale fournie à chaque échantillon est de 0,13 µCi

Age des plants	12 jours		24 jours
Durée de métabolisation	6 h	24 h	24 h
Produits d'oxydation des lignines : en % du ^{14}C absorbé	0,5	3,7	8,75

En fonction des données actuelles sur la biosynthèse des lignines, il apparaît que l'acide caféique n'est pas directement utilisable dans l'édification de ces molécules ; seuls interviennent après activation et réduction en alcool, les acides p-coumarique, férulique et sinapique (SARKANEN et LUDWIG, 1971). Pour confirmer les résultats

* Le marquage des lignines est apprécié en déterminant la radioactivité d'une fraction contenant les aldéhydes libérés après oxydation alcaline des "klason lignins" (RHODES et WOOLTORTON, 1973). Avant ce traitement, le résidu d'extraction est soumis à une hydrolyse par NaOH 5 N, 20 mn à la température du laboratoire, afin d'éliminer certains acides phénols éventuellement présents sous forme d'esters insolubles (WHITMORE, 1974).

précédents, j'ai essayé d'identifier la nature des intermédiaires concernés en recherchant dans la fraction phénolique soluble les acides cinnamiques radioactifs*. En dehors de l'acide caféique,la radioactivité la plus importante se retrouve localisée au niveau de l'acide férulique. Ainsi, l'acide chlorogénique participerait donc à la synthèse des lignines par libération puis transformation de la molécule d'acide caféique en acide férulique.

Conclusion

L'ensemble de ces résultats a permis de vérifier que de jeunes plants de Tomate traités par un apport d'acide quinique présentent la faculté d'absorber et d'utiliser ce composé :

- on note une augmentation des teneurs en composés phénoliques solubles et en produits de type lignine,
- une fraction du précurseur est intégrée dans la voie de l'acide shikimique,et vraisemblablement au-delà, dans les composés aromatiques du végétal,
- une part importante de l'acide quinique fourni est orienté dans la synthèse de depsides.

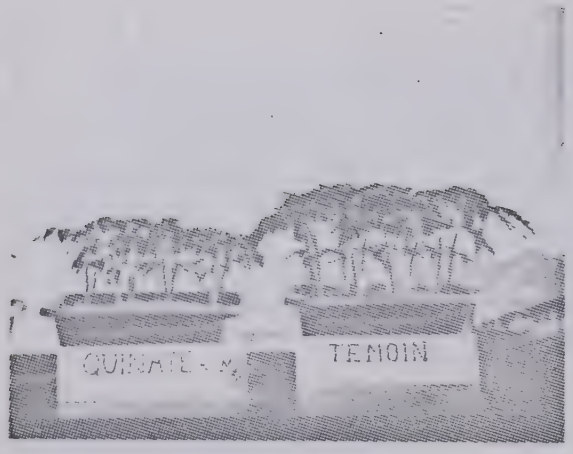
Ces formes combinées de l'acide quinique ne s'accumulent seulement que de manière transitoire. L'étude du devenir de l'acide chlorogénique démontre leur intervention dans la synthèse des lignines par libération puis transformation de la fraction aromatique. La partie quinique pourrait participer à ces synthèses via l'acide shikimique et les unités phénoliques. Relais sur la voie de formation des composés aromatiques plus complexes, les depsides quantitativement importants chez la Tomate, assureraient donc une fonction de réserve.

C - EFFET D'UNE AUGMENTATION DE LA TENEUR EN COMPOSES PHENOLIQUES SUR LA CROISSANCE DE *Lycopersicum esculentum*

A la suite des résultats précédents, je me propose d'apprécier maintenant le retentissement du traitement sur la croissance du végétal, et d'envisager finalement l'intervention éventuelle des composés phénoliques dans ce processus.

---

* Les acides phénoliques présents sous forme d'esters solubles sont identifiés, après hydrolyse basique (NaOH 2 N), par chromatographie électrophorèse sur papier (ALIBERT et al., 1969), et la radioactivité correspondant à chaque composé mesurée au spectromètre à scintillation liquide Packard.



(a)

(b)

Ac. quinique 10^{-2} M/25 Témoin

(c)

Photos 2

Apparence des plants traités pendant 7 jours (a) et 12 jours (b,c) par l'acide quinique 4×10^{-2} M.

1.- Mise en évidence d'un ralentissement de croissance de plants de Tomate traités par l'acide quinique

• Aspect morphologique

Le traitement par l'acide quinique (4×10^{-2} M) conduit à des plants dont la croissance est ralentie -diminution de taille et d'épaisseur des tiges, feuilles de surface réduite- mais pour lesquels cependant aucune anomalie morphologique n'est décelée (Photos 2 a, b, c) : on retrouve les mêmes feuilles latérales portant chacune un nombre identique de folioles. Les plants semblent, en quelque sorte, ne présenter simplement qu'une forme de nanisme.

La diminution de taille intéresse essentiellement la partie aérienne : le poids de matériel frais ou sec est sensiblement 3 fois moins important dans le cas du système foliaire des individus traités, 4 fois en ce qui concerne les tiges (Tableau VI). Pour ces dernières, les modifications les plus marquées portent sur les entre-noeuds apparus tardivement (Tableau VI) : au niveau du deuxième entre-noeud on obtient respectivement 10 et 8 fois moins de matière fraîche et sèche pour les essais.

TABLEAU VI

Caractéristiques pondérales d'organes de plants témoins et traités pendant 16 jours par l'acide quinique 4×10^{-2} M. Trois séries d'expériences distinctes ont été réalisées avec des résultats identiques. Les valeurs mentionnées (moyenne de 16 plants) correspondent à une expérience particulière

Organes	Matériel frais g/plant		Matériel sec g/plant		Teneur en eau en g/g mat. sec	
	Témoin	Essai	Témoin	Essai	Témoin	Essai
Feuilles	2,79	1,05	0,26	0,09	9,73	10,66
Tiges	3,02	0,70	0,12	0,03		
Hypocotyle	0,91	0,36	0,04	0,02	21,75	17,00
1e entre-noeud	1,08	0,24	0,04	0,01	26,00	23,00
2e entre-noeud	1,03	0,10	0,04	0,005	24,75	19,00
Racines	0,62	0,81	0,05	0,05	11,50	15,20

Il est en revanche assez remarquable de noter que la croissance du système radiculaire semble peu affectée par le traitement (Photo 2c, Tableau VI).

La teneur en eau est, dans le cas des essais, toujours plus faible pour les tiges (Tableau VI) ; cette observation est à rapprocher de la réduction de croissance particulièrement marquée au niveau de ces organes.

• Aspects au niveau cellulaire

On interprète souvent les effets de certains composés sur la croissance comme une conséquence soit d'un changement de la taille des cellules, soit d'un changement de leur nombre, soit encore des deux processus à la fois.

Afin de déterminer à quel type de modifications correspondait le ralentissement engendré en stimulant le pool phénolique, j'ai estimé les quantités d'ADN présentes dans les organes de plants témoins et traités (Tableau VII) et comparé la taille des cellules en prélevant l'épiderme le long de l'hypocotyle et des différents entrenoeuds (Planche 1, page 44).

TABLEAU VII

Détermination des quantités d'ADN dans différents organes de plants de Tomate témoins ou traités 15 jours par l'acide quinique (4×10^{-2} M)

	Quantité d'ADN µg/organe		Facteur de réduction	
	T	E	de la division cellulaire T/E (ADN)	de la croissance T/E (mat.frais)
Feuilles	156	73	2,2	2,7
Entrenoeud	119	38,5	3	4,4
Hypocotyle	1 064	538	2	3
Racines	275	263	~ 1	~ 1

Les résultats du tableau VII montrent que pour chacun des organes aériens considérés (feuilles, entrenoeud, hypocotyle), les quantités d'ADN sont inférieures pour les individus ayant subi l'apport d'acide quinique.

En ce qui concerne le système radiculaire dont la croissance n'est pas affectée par le traitement, les quantités relevées sont identiques.

Si on fait abstraction d'une éventuelle interférence due au phénomène de polyploïdie et si on considère que la quantité d'ADN par organe est représentative du nombre de cellules, un effet du

traitement est de réduire la multiplication cellulaire.

Cependant, on peut noter que la réduction de croissance sur la base du poids de matière fraiche est plus marquée que la diminution de la division cellulaire (Tableau VII). Par ailleurs, des observations au microscope, effectuées au niveau des cellules épidermiques de l'hypocotyle et des entrenoeuds de la tige (planche I p. 44) montrent qu'il se produit également un ralentissement du grandissement. Bien que cette évaluation ne concerne que l'assise épidermique, il semble néanmoins que les modifications de croissance du végétal doivent relever à la fois des deux types d'action envisagés.

2.- Indices de l'intervention des composés phénoliques dans les modifications de croissance

• Mise en évidence de corrélations entre le degré de stimulation du pool phénolique et l'importance du ralentissement de croissance au cours du traitement

L'apport d'acide quinique au cours du traitement se répercute sur les teneurs en composés phénoliques solubles. Au niveau des racines, les phénols totaux sont trois fois plus abondants dans les essais. Cependant, en valeur absolue, ces teneurs sont nettement inférieures à celles des parties aériennes ; cette différence dans les niveaux d'accumulation pourrait expliquer que la croissance du système radiculaire n'est pas affectée. En ce qui concerne les parties aériennes (Figure 6), c'est pour un traitement de courte durée (jusqu'à 12 jours)

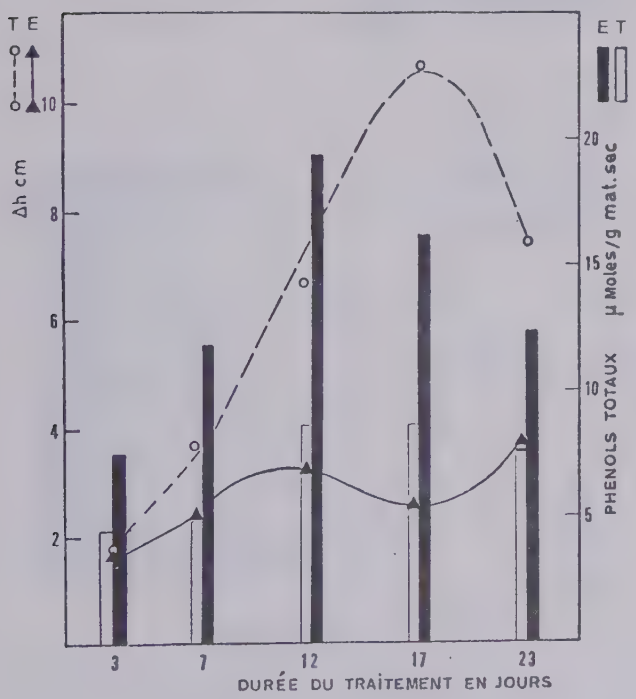
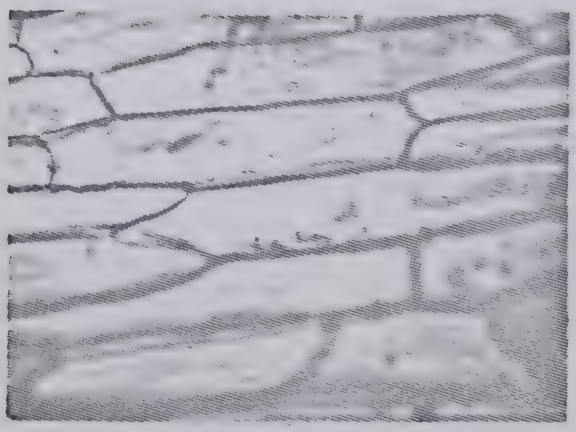


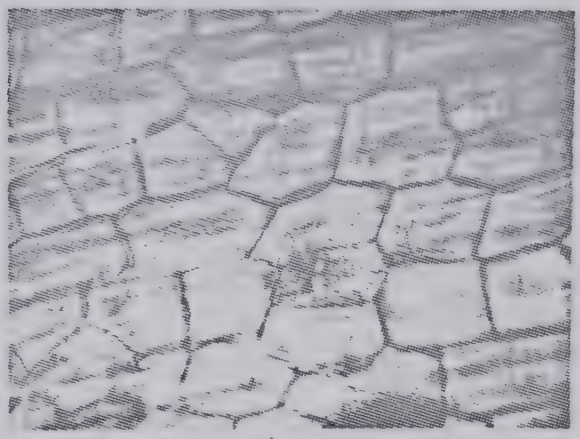
Figure 6

Croissance et contenu phénolique des plants témoins (T) et traités (E) par l'acide quinique 4×10^{-2}M. La croissance est mesurée par l'accroissement de l'allongement moyen ($\triangle$h en cm) de la partie aérienne pendant les périodes retenues. L'allure des courbes de croissance est identique lorsque l'on retient le poids de matériel frais ou sec comme critère.

EPIDERME DU 2ème ENTRE-NŒUD

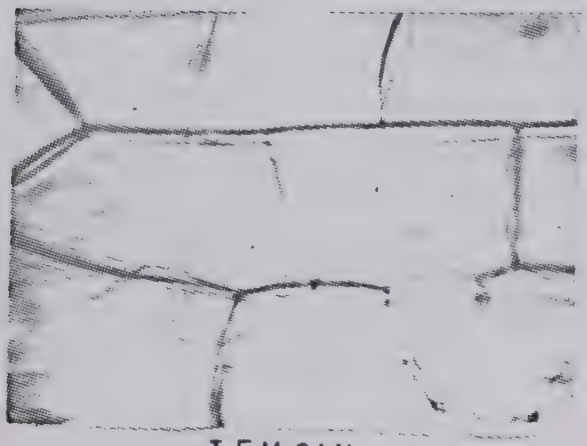


TEMOIN

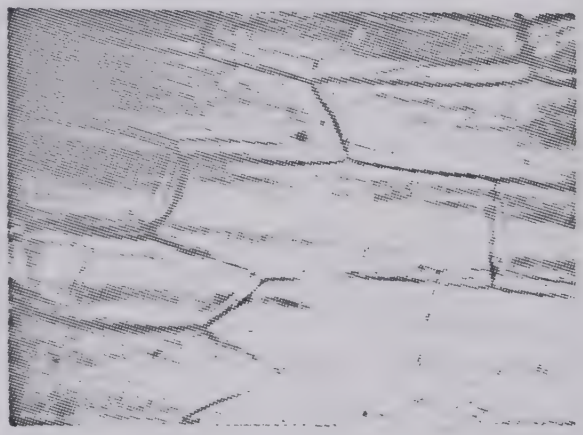


ESSAI

EPIDERME DU 1er ENTRE-NŒUD

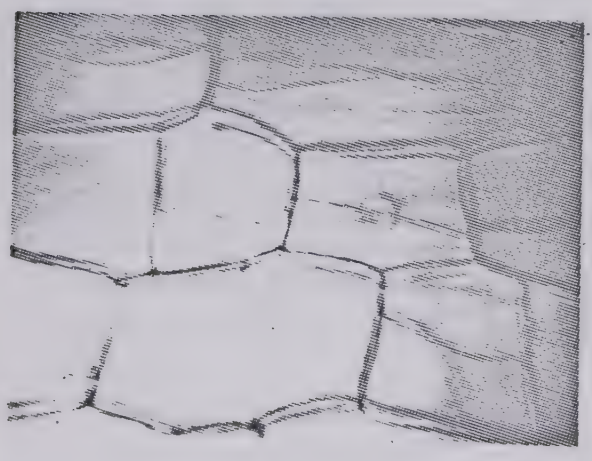


TEMOIN

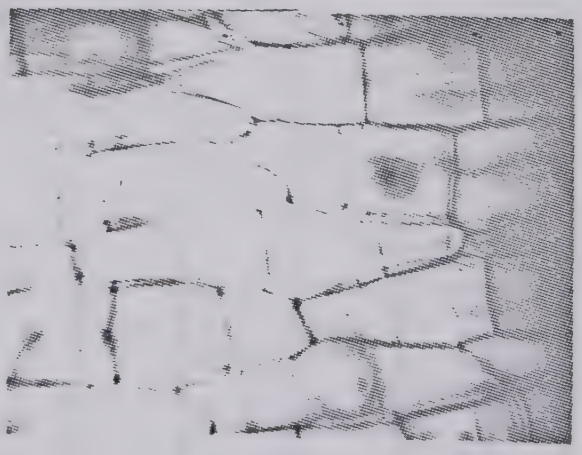


ESSAI

EPIDERME DE L'HYPOCOTYLE



TEMOIN



ESSAI

Planche 1 - Comparaison des cellules épidermiques prélevées au niveau de l'hypocotyle et des entrenoeuds de plants de Tomate témoins ou traités 16 jours par l'acide quinique 4 x 10^{-2} M (grossissement : x 250).

que la stimulation phénolique est la plus importante ; par la suite, cette stimulation demeure mais dans des proportions plus faibles, alors que la teneur en composés phénoliques des plants non traités se maintient à une valeur constante.

L'accumulation des polyphénols constatée au 12e jour précède un ralentissement de la vitesse moyenne d'allongement des parties aériennes (Figure 6) alors que cette même vitesse augmente à nouveau lorsque la stimulation phénolique s'atténue.

Cette observation suggérait déjà, lors du développement de la plante, une corrélation inverse entre les deux phénomènes que j'ai par la suite tenté de confirmer.

. Effet de différentes concentrations en acide quinique

J'ai comparé pour un traitement de 12 jours les répercussions engendrées par l'apport de solutions d'acide quinique à différentes concentrations (Photo 3, page 46). Les résultats du tableau VIII montrent que la teneur en composés phénoliques et la réduction de croissance varient parallèlement en fonction des concentrations en précurseurs.

TABLEAU VIII

Effet de différentes concentrations en acide quinique sur la croissance et le contenu en phénols totaux de Lycopersicum esculentum

Quinate K	Teneurs en phénols totaux µMol/g mat. sec	Mat.frais g/plant	Mat. sec g/plant	Hauteur de la partie aérienne (cm)
0	8,35	4,9	0,326	15
10^{-2} M	12,2	1,9	0,143	12,5
2×10^{-2} M	14,2	1,7	0,123	11,2
4×10^{-2} M	22,6	1	0,086	9

. Influence de différents composés sur la teneur en phénols et la croissance de Lycopersicum esculentum

Afin de contrôler si les modifications survenues représentaient une réponse spécifique à l'apport d'un précurseur du pool phénolique, j'ai mesuré la croissance et le contenu phénolique de plants traités par différents composés organiques :

- les acides citrique et tartrique, qui possèdent comme l'acide quinique la fonction acide et permettent, apportés sous forme de sel de potassium, de vérifier un éventuel effet de ce cation,

Photo 3

Influence de différentes concentrations en acide quinique (de gauche à droite : témoin ; acide quinique 4×10^{-2} M ; acide quinique 2×10^{-2} M ; acide quinique 10^{-2} M) sur la croissance de Lycopersicum esculentum.

Photo 4

Effet spécifique sur le ralentissement de croissance de précurseurs du métabolisme aromatique (de gauche à droite : phénylalanine 10^{-2} M quinate de potassium 4×10^{-2} M ; témoin ; citrate de potassium 4×10^{-2} M ; tartrate de potassium 4×10^{-2} M ; inositol 4×10^{-2} M)

- l'inositol dont la structure s'apparente à l'acide quinique,
- un composé dont le devenir métabolique est largement orienté dans la production de substances phénoliques, la phénylalanine et un précurseur direct, l'acide cinnamique.

Seuls les essais correspondant à l'apport d'acide quinique, de phénylalanine et d'acide cinnamique présentent une stimulation du pool phénolique (Tableau IX). Les traitements par l'inositol, les acides citrique et tartrique ne provoquent que de légères modifications sur la croissance des plants peu comparables avec la diminution importante de taille des individus soumis à l'action de l'acide quinique, de la phénylalanine (Photo 4 page 46) ou de l'acide cinnamique. L'effet observé paraît donc spécifique de l'apport d'un précurseur du métabolisme aromatique.

TABLEAU IX

Les composés ont été apportés à la concentration 4×10^{-2} M excepté la phénylalanine 10^{-2} M et l'acide cinnamique 2×10^{-3} M. En ce qui concerne les acides citrique, tartrique, quinique et cinnamique, le pH du milieu est ajusté à 5 par addition de K_2CO_3 ; les solutions de phénylalanine et d'inositol aux concentrations utilisées présentent un pH de 5. Les conditions de traitement sont identiques à celles décrites pour l'acide quinique. Les plants ont été récoltés après 12 jours de traitement. Les traitements par l'acide citrique et la phénylalanine ont été répétés deux fois ; les résultats ne diffèrent pas significativement d'une expérience à l'autre

Composés apportés	Teneurs en phénols totaux µMol/g mat.sec	Mat. frais g/plant	Mat. sec g/plant	Hauteur des plants (cm)
-	11,8	3,7	0,21	14,4
Tartrate K	11,3	3,2	0,20	13,3
Citrate K	12,4	3,4	0,20	14,2
Inositol	11,3	2,9	0,18	13,3
Quinate K	24,6	1,15	0,09	7,2
Phé-ala	22,6	1,25	0,089	7,9
Cinnamate K	23,7	0,73	0,06	6,5

CONCLUSION ET DISCUSSION

Des observations *in vivo* ont déjà permis d'établir des corrélations apparentes entre la teneur en composés phénoliques et une réduction de croissance. GELINAS et POSTLETWAIT (1969) notent par exemple sur certains mutants nains une production accrue de composés phénoliques. ENGELSMA et MEIJER (1965), RUSSEL et GALSTON (1969) constatent par ailleurs lors d'une exposition à la lumière, une diminution de

croissance et une stimulation de certains polyphénols. Nous avons également pu obtenir des réponses analogues sur la Tomate par des traitements variés : action de l'éthylène, carences en soufre, en bore (MARIGO, résultats non publiés).

Cependant, ces différentes données ne permettent pas de dégager une relation de cause à effet, les deux réponses enregistrées pouvant être des conséquences indépendantes du traitement.

Les résultats décrits dans ce travail apportent en revanche différents arguments permettant d'associer l'augmentation de la teneur en phénols solubles à la réduction de croissance observée:

- Etant donné le traitement retenu, l'augmentation du contenu phénolique constitue une conséquence très directe de l'apport des molécules de précurseur, les modifications de croissance enregistrées pouvant découler de cette première réponse du végétal;
- la diminution de taille est observée chaque fois que la stimulation est obtenue, quel que soit le précurseur utilisé;
- Cette manifestation est de plus fonction de l'intensité de la stimulation phénolique.

Le modèle expérimental décrit présente par ailleurs un certain nombre d'avantages. Le traitement peut être considéré comme "physiologique" puisqu'il porte sur des plants entiers qui absorbent par le système radiculaire le précurseur mis à leur disposition. L'acide quinique a été choisi de préférence aux intermédiaires plus directs des polyphénols : il s'agit d'une substance naturellement présente sous forme libre et combinée chez la Tomate (FUCHS et De VRIES, 1968) et qui constitue un des précurseurs du noyau aromatique, pouvant s'accumuler de façon importante chez différents végétaux. Par ailleurs, les composés phénoliques solubles dont la teneur est stimulée sont ceux qui existent initialement dans la plante.

Les données exposées définissent donc une situation dans laquelle les composés phénoliques interviennent dans le contrôle de la croissance des organes aériens chez Lycopersicum. La nature du ou des mécanismes impliqués reste maintenant à préciser.

CHAPITRE II

RECHERCHES PRELIMINAIRES SUR LES MODALITES D'ACTION DES COMPOSES PHENOLIQUES DANS LES MODIFICATIONS DE CROISSANCE

Les mécanismes se rapportant à l'action inhibitrice des composés phénoliques dans la croissance végétale demeurent encore très imprécis. On a signalé que la plupart d'entre eux sont des antagonistes des hormones végétales, mais on ne dispose actuellement que de peu de données sur la nature de ces interactions. En particulier, on apprécie mal si ces substances possèdent des propriétés anti-hormonales spécifiques, c'est à dire si elles agissent sur des étapes ponctuelles touchant au métabolisme ou à certaines réactions primaires de chaque hormone. Certains auteurs, dont KEFELI et KADYROV (1971), pensent par ailleurs que l'activité inhibitrice des phénols relève plutôt d'un abaissement des processus métaboliques fondamentaux pouvant ralentir toute forme de croissance induite par les hormones.

En fonction de ces données, on ne peut donc, à priori, porter son attention sur un type de mécanisme précis ; j'ai alors tenté d'aboutir, dans un premier temps, à une connaissance plus approfondie des modifications engendrées par le traitement au niveau de différents constituants biochimiques et du contenu hormonal du végétal.

A - METHODOLOGIE

1.- Isolement de différentes familles de constituants biochimiques - Méthodes de dosage retenues

Les différentes déterminations effectuées en double exemplaire ont été réalisées à partir de 500 mg de matériel végétal lyophilisé, selon un protocole séquentiel permettant d'obtenir successivement :

- Chlorophylles

Les pigments chlorophylliens (a et b) sont extraits à deux reprises par 50 ml d'acétone à 80 %, à froid et à l'abri de la lu-

mière, puis dosés par spectrophotométrie à 652 nm selon les données de BRUINSMA (1961).

- Protéines

Les résidus d'extraction précédents sont traités par 30 ml de NaOH 0,3 N à 27° C pendant 24 h. Après centrifugation, les protéines présentes dans le surnageant sont estimées par la méthode du biuret (LAYNE, 1957).

- Cellulose

On isole les parois en délipidant les culots de centrifugation par 100 ml d'un mélange benzène - alcool (2-1 V/V). Des épuisements successifs des parois par le mélange (1-1 V/V) oxalate d'ammonium 0,5 % acide oxalique 0,5 % (3 h à 85° C) puis par NaOH 10 %, permettent d'éliminer respectivement les matières pectiques et les hémicelluloses. Le résidu lavé à plusieurs reprises par H_2O est lyophilisé. A ce stade, les celluloses sont extraites par H_2SO_4 à 72 %, 2 h à 20° C, et la fraction cellulosique estimée par double pesée avant et après extraction du résidu précédent.

- Lignines

Après élimination des celluloses, le résidu est lavé par H_2O, séché par lyophilisation et les lignines de "klason" déterminées directement par simple pesée (BERGMANN, 1964).

2.- Extraction, purification et dosage des acides phénoliques

Les acides phénoliques sont libérés de leurs combinaisons successivement par hydrolyses basique et acide. On traite directement 500 mg de poudre végétale par NaOH 2 N, sous courant continu d'azote, pendant 12 h. La suspension, réacidifiée par HCl concentré, est amenée à pH 2 puis centrifugée. Les acides phénols, initialement présents sous forme d'esters sont extraits par l'éther éthylique. La phase aqueuse recueillie est ensuite hydrolysée 1/2 h en milieu acide (HCl N) à 100° C sous azote, puis après avoir ajusté à 2 la valeur du pH, les acides phénols liés par des liaisons éther-oxydes, extraits comme précédemment par l'éther éthylique. Les deux phases éthérées sont réunies, évaporées sous vide, et les acides phénoliques purifiés par passage sur colonne de Sephadex LH 20 (ALIBERT, 1975). Après élution par le mélange solvant eau - acétone (80-20) HCl 0,1 % et évaporation à sec, les différents composés sont dosés automatiquement par chromatographie liquide sur colonne de Polyclar (ALIBERT, 1973).

B - INFLUENCE DU TRAITEMENT SUR LES TENEURS EN DIFFERENTS CONSTITUANTS BIOCHIMIQUES

Ces déterminations ont été abordées en vue d'apprécier les répercussions du traitement :

- sur certains aspects du métabolisme fondamental de la plante,
- sur les variations des constituants phénoliques solubles ou insolubles (lignines)

pouvant être particulièrement impliqués dans la réduction de croissance.

1.- Composés phénoliques et métabolisme fondamental

Certains travaux ont relaté un mode d'intervention potentiel des composés phénoliques dans différents aspects du métabolisme fondamental. J'ai recherché un éventuel effet de ce type en suivant les modifications des teneurs en deux catégories de constituants retenus comme substances de référence : les protéines solubles et les chlorophylles.

Les résultats obtenus (Tableau IX) montrent que le traitement par l'acide quinique ne paraît pas affecter les teneurs en ces deux familles de composés.

TABLEAU IX

Déterminations des teneurs en chlorophylles et en protéines dans les parties aériennes de plants de Tomate témoins ou soumis au traitement quinate (4×10^{-2} M). Les résultats sont exprimés en mg par g de matériel végétal sec

Nombre de jours de traitement	Chlorophylles		Protéines	
	Témoin	Essai	Témoin	Essai
7	12	11,5	92,5	93,7
12	11,5	10,5	82,5	82,5
17	10,5	9,5	78,7	82,5
23	9,5	8,0	67,5	67,5

Cette comparaison,bien que portant sur un nombre limité de "marqueurs",ne semble pas étayer une intervention des polyphénols selon l'hypothèse de départ.

TABLEAU X

Répercussions d'un traitement par l'acide quinique et la phénylalanine (12 jours) sur les teneurs en acides phénols de Lycopersicum esculentum. Les résultats sont exprimés en µMoles par g de matériel végétal sec

	Parties aériennes			Racines		
	Témoin	Phe-ala $1x10^{-2}$ M	Ac. quinique $4x10^{-2}$ M	Témoin	Phe-ala $1x10^{-2}$ M	Ac. quinique $4x10^{-2}$ M
Phénols totaux (en équivalent acide chlorogénique)	8 350	22 000	22 610	2 000	8 000	7 500
Série cinnamique						
Ac. Cinnamique	10	46	47	10	109	10
p-coumarique	310	1 050	1 280	22	430	206
Caféique	15 300	14 840	22 000	210	1 470	1 560
Férulique	620	1 800	1 075	650	2 025	1 150
$\frac{\text{p-coumarique}}{\text{caféique}} \times 100$	2	7	5,8	10	29	13,2
Série benzoïque						
Ac. Benzoïque	40	150	100	t	t	t
p-h-benzoïque	90	900	20	50	110	122
Salicylique	t	t	t	15	570	105
Vanillique	20	120	90	180	127	390
Gentisique	80	310	280	t	t	t
Protocatéchique	t	t	1 340	t	t	5 520

2.- Répercussions du traitement sur le métabolisme secondaire

a - Etude des variations des teneurs en acides phénoliques

Chez la Tomate, on retrouve après hydrolyse de leurs combinaisons naturelles les acides phénoliques les plus couramment rencontrés dans le règne végétal (MARIGO, 1976), certains considérés comme des antagonistes de l'auxine (p-coumarique, p-hydroxybenzoïque, vanillique) mais également un composé synergique, l'acide caféique (TOMASZEWSKI et THIMANN, 1966) (Tableau X). J'ai démontré par ailleurs dans ce matériel, que l'acide caféique, le mieux représenté, existe essentiellement sous forme d'acide chlorogénique (MARIGO et al., 1975).

Les traitements par l'acide quinique 4×10^{-2} M et la phénylalanine 10^{-2} M conduisent à une stimulation globale du pool phénolique dans les parties aériennes. Dans les deux cas, les acides phénols des séries cinnamique et benzoïque voient généralement leurs teneurs stimulées. Dans la série benzoïque, on relève une très forte stimulation du taux d'acide protocatéchique en présence d'acide quinique, alors que ce composé n'apparaît pas après apport de phénylalanine. D'un point de vue métabolique, ce résultat confirme chez la Tomate l'origine biosynthétique de ce diphénol via l'acide déshydroshikimique (MARIGO et al., 1969). En relation avec la croissance et en considérant que les deux précurseurs agissent de manière identique il faut admettre que l'acide protocatéchique n'intervient pas dans les modifications de taille enregistrées.

Les différences de comportement entre acides cinnamiques dihydroxylés et monohydroxylés ont retenu mon attention. Si on considère au niveau des parties aériennes la valeur du rapport $\frac{\text{ac. p-coumarique}}{\text{ac. caféique}}$ (acides phénoliques quantitativement les plus représentatifs), celui-ci est trois fois plus important dans chaque cas où se produit une diminution de croissance. Cette augmentation relative des unités monophénoliques, in vivo, pouvait être reliée avec le rôle inhibiteur de ces composés sur la croissance par l'intervention de l'AIA oxydase.

Dans le cas des racines dont la croissance n'est pas affectée par le traitement, on retrouve, quelle que soit la nature du précurseur, une stimulation des différents acides phénols présents (Tableau X p. 52). Cependant, on observe également une augmentation du rapport $\frac{\text{ac. p-coumarique}}{\text{ac. caféique}}$ de plus faible amplitude toutefois que celle constatée dans les parties aériennes. Ces résultats n'apportent pas d'arguments suffisants pour suggérer une intervention spécifique du rapport mono/diphénol dans les modifications de croissance constatées

En ce qui concerne les acides de la série benzoïque, la comparaison de leurs variations dans les systèmes aériens et radiculaires lors de l'apport des deux précurseurs ne permet pas de dégager une relation de cause à effet avec la diminution de croissance enregistrée.

b - Recherches de modifications au niveau des constituants de la paroi cellulaire

Au niveau de la paroi cellulaire, on assiste à une diminution rapide des teneurs en cellulose et à une augmentation concomitante de la fraction lignine (Tableau XI). Cette opposition est particulièrement mise en évidence sur la base de la comparaison du rapport lignine/cellulose, sensiblement deux fois plus important à chaque stade considéré dans le cas des lots essais.

TABLEAU XI

Répercussions engendrées par l'apport d'acide quinique 4×10^{-2} M sur les teneurs en cellulose et en lignine des parties aériennes de plants de Tomate. Les résultats sont exprimés en mg par g de matériel végétal sec

Nombre de jours de traitement	Cellulose		Lignine de "klason"		Lignine/cellulose	
	Témoin	Essai	Témoin	Essai	Témoin	Essai
7	275	201	37,5	52,5	0,136	0,256
12	277	200	40	60	0,142	0,300
17	267	200	45	55	0,167	0,279
23	252	167	65	67,5	0,256	0,402

Ces données sont à rapprocher de résultats fragmentaires décrits dans la littérature : le traitement de coléoptiles d'Avoine et de Sarrasin par l'acide shikimique entraîne une augmentation de la lignification (ISHERWOOD, 1960), ce composé jouant au même titre que l'acide quinique un rôle de précurseur. De plus, certains composés phénoliques, les coumarines, inhibent l'incorporation du glucose ^{14}C dans la fraction cellulosique ce qui conduit à une désorganisation de la structure de la paroi (HARA et al., 1973). Dans ce travail, ces deux types de réponses sont caractérisées simultanément à la suite d'un traitement commun par l'acide quinique : le déséquilibre engendré dans la production de ces constituants ainsi que l'im-

prégnation précoce et anormale de la matrice pariétale par le polymère phénolique pourraient entraîner une diminution des capacités d'extension de la paroi, ralentissant le grandissement cellulaire.

Parallèlement à cette hypothèse, d'autres modifications pouvaient être à l'origine de la réduction de croissance observée et en particulier des déséquilibres de la balance hormonale du végétal.

C - EVALUATION D'EVENTUELLES MODIFICATIONS DU CONTENU HORMONAL

J'ai tenté de compenser le ralentissement de taille des individus traités en apportant, de manière exogène au niveau du bourgeon apical de plants intacts, différentes hormones végétales (5 µl d'une solution aqueuse à différentes concentrations). Ce type d'approche présente un certain nombre de limites, liées en particulier à la mauvaise connaissance du mode de pénétration des molécules apportées et de leur diffusion dans les tissus du végétal traité. Cependant, dans un premier temps, cette technique était susceptible de fournir des indications sur de possibles modifications du contenu hormonal.

. Cytokinines

Le traitement "quinate" affectant la division cellulaire, des essais ont été réalisés en utilisant la benzyladénine, hormone intervenant plus particulièrement dans cette composante de la croissance (GALSTON et DAVIES, 1969). Sur la base des paramètres retenus (allongement, masse de matière fraîche ou sèche) et malgré un éventail assez large des concentrations utilisées (compris entre 1 et 20 µg/5 µl H_2O), l'application de cette hormone n'a provoqué aucune modification tant au niveau des plants cultivés dans des conditions normales que dans le cas des individus traités.

. Gibberellines

Quelles que soient les doses utilisées, l'acide gibberellique intervient en favorisant la croissance des plants de Tomate témoins (Tableau XII page 56). L'effet, qui concerne seulement les parties aériennes, se traduit par un allongement des organes conducteurs dont l'intensité est fonction de la quantité de GA_3 déposée, ainsi que par une augmentation de la masse végétale (matériel frais et sec).

Cette stimulation de la croissance se manifeste également lorsque GA_3 est déposé sur les plants dont la teneur en phénols est stimulée ; si on compare l'accroissement respectif de l'élongation des parties aériennes de plants témoins ($\triangle T$) et essais ($\triangle E$), on constate, de plus, que pour les différentes doses utilisées l'acide gibberellique permet de compenser en partie la diminution de taille

des individus soumis au traitement quinate. Cette observation est déjà visible pour un dépôt de 1 µg (Photo 5, page 57) ; il faut remarquer cependant que le "rattrapage" est partiel et concerne essentiellement l'allongement et la masse de matière fraîche -donc probablement la phase de grandissement cellulaire dans laquelle intervient cette hormone (GALSTON et DAVIES, 1969)- mais est beaucoup moins marqué au niveau du poids de matériel sec.

TABLEAU XII

Effet d'un apport exogène de gibberellines sur la croissance de plants de Tomate témoins (T) ou traités (E) 16 jours par l'acide quinique (10^{-2} M) ; $\triangle$T et $\triangle$E représentent les accroissements de taille respectifs par rapport aux mêmes individus non soumis à l'action des gibberellines. Chaque détermination, réalisée 16 jours après le dépôt de GA_3, correspond à la moyenne des valeurs obtenues pour 16 plants

Quantité de GA_3 déposée µg/5 µl H_2O	Hauteur de la partie aérienne en cm				Matériel sec (mg/plant)			
	E	$\triangle$E	T	$\triangle$T	E	$\triangle$E	T	$\triangle$T
0	11	-	17,86		231	-	430	-
1 µg	17,3	6,3	19,9	2,04	279	48	469	39
5 µg	19,35	8,35	21,3	3,44	326	95	516	86
10 µg	21,65	10,65	22,9	5,04	322	91	520	90

. Auxine

A l'inverse des gibberellines, l'auxine ne manifeste pas d'action positive lorsqu'elle est appliquée à des plants témoins (Tableau XIII) tout comme si cette hormone était présente dans le végétal en quantités suffisantes pour assurer un développement optimal. Bien au contraire, l'apport d'AIA à des concentrations supérieures à 0,5 µg pour 5 µl entraîne une réduction de taille d'autant plus marquée que l'auxine est déposée en quantités importantes (Tableau XIII p. 58) Conformément à d'autres observations de ce type (GRUNWALD et LOCKARD, 1973 ; MSUGE et VIGLIERCHIO , 1975), un seuil de tolérance vis-à-vis de l'AIA semble exister au-delà duquel l'auxine, au lieu d'intervenir en favorisant le développement, exerce au contraire une action inhibitrice.

En ce qui concerne les individus dont la teneur en phénols est stimulée, l'apport exogène d'auxine ne permet en aucun cas un "rattrapage" de taille comme on pouvait l'espérer (Tableau XIII).

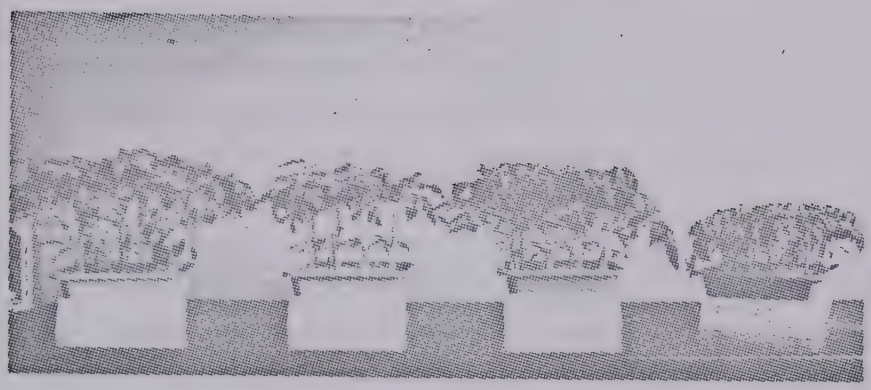


Photo 5

Effet d'un apport exogène en acide gibberellique (1 µg/5 µl) sur la croissance de plants de Tomate témoins ou traités par l'acide quinique (10^{-2} M). De gauche à droite : plants témoins après application de GA_3 (témoin AG 1 µg), plants traités par l'acide quinique et GA_3 (essai AG 1 µg), plants témoins (témoin AG 0) et essais quinate (essai AG 0).

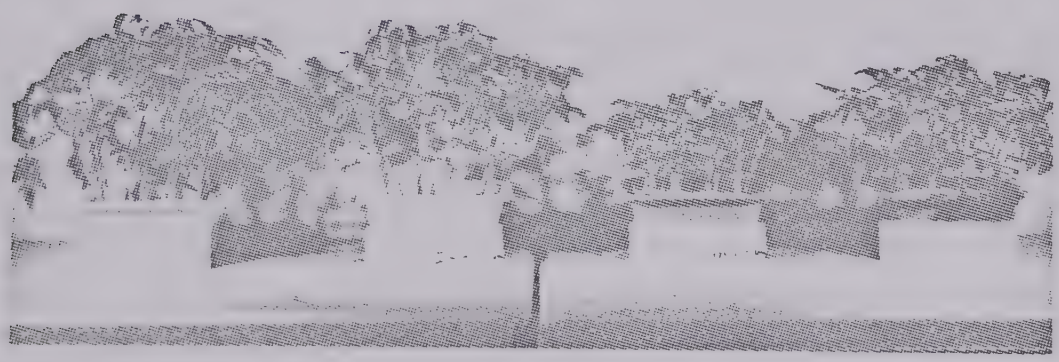


Photo 6

Effet d'un apport exogène d'auxine (0,5 µg/5 µl) sur la croissance de plants témoins ou traités par l'acide quinique 10^{-2}M. De gauche à droite : plants témoins (témoin AIA 0), après application d'auxine (témoin AIA 0,5 µg) ; plants essais traités par l'acide quinique et l'auxine (essai AIA 0,5 µg), plants essais traités par l'acide quinique (essai AIA 0).

De plus, une application de 0,5 µg d'auxine qui ,dans les mêmes conditions,affecte peu les témoins, accentue au contraire la réduction de croissance de plants traités par l'acide quinique (Photo 6 page 57). L'ensemble de ces observations, et en particulier ces deux derniers résultats, suggère l'existence d'une situation hyperauxinique chez les individus traités qui pourrait d'ailleurs être responsable des modifications de croissance enregistrées.

TABLEAU XIII

Effets d'un apport exogène d'auxine sur la croissance de plants de Tomate témoins et traités 16 jours par l'acide quinique (10^{-2} M). Chaque détermination, réalisée 16 jours après le dépôt en AIA, est la valeur moyenne obtenue à partir de 16 individus

		Quantité d'auxine déposée par plant (µg/5 µl H_2O)				
		0	0,1	0,5	1	5
Témoins	Hauteur des parties aériennes (cm)	19,1	19	18,8	17,5	13,8
	Matériel sec g/plant	0,325	0,319	0,309	0,230	0,180
Essais	Hauteur des parties aériennes (cm)	12,8	12,6	10,8	8,2	7,6
	Matériel sec g/plant	0,159	0,137	0,103	0,080	0,062

En résumé, les éléments de cette étude permettent de dégager un comportement opposé de l'AIA et de l'acide gibberellique sur la croissance de plants traités par l'acide quinique. Les résultats se rapportant à l'AIA ont retenu plus particulièrement mon attention dans la suite de ce travail, car en ce qui concerne les gibberellines, l'effet paraît moins spécifique (l'hormone stimule également, quelles que soient les concentrations, la croissance des plants cultivés dans les conditions normales).

CONCLUSION

Les résultats présentés dans ce chapitre précisent les caractéristiques essentielles des plants de Tomate soumis à un apport d'acide quinique. La réduction de taille qui affecte les parties aériennes des individus traités ne semble pas redevable d'un bouleversement

profond du métabolisme général du végétal puisque deux processus fondamentaux, sur la base de la comparaison des teneurs en chlorophylles et en protéines, ne sont pas affectés par le traitement. Par contre, un effet marqué paraît localisé au niveau de la paroi cellulaire, où on assiste parallèlement à une diminution du taux en cellulose et à une nette augmentation de la fraction lignine. Ce déséquilibre constaté au niveau des constituants pariétaux pourrait représenter un facteur impliqué dans les modifications de croissance.

En ce qui concerne la recherche d'un effet des acides phénoliques, l'estimation de leurs teneurs au cours du traitement ne permet pas d'attribuer à ces substances un rôle spécifique dans les modifications de croissance. Ce type d'approche se heurte en effet à de nombreuses difficultés :

- les déterminations portent sur des acides phénols totaux, mélange de pools chimiquement différents et spatialement séparés, et les résultats globaux peuvent dans certains cas masquer les variations des formes plus particulièrement concernées.
- de plus, bien qu'un effet majeur dans la régulation de l'AIA oxydase ait été attribué à ces acides, ceux-ci ne représentent qu'une famille de composés et il n'est pas exclu que d'autres structures puissent également jouer un tel rôle in vivo.

En revanche, et contrairement au concept classique selon lequel en tant qu'inhibiteurs de croissance les composés phénoliques détermineraient une diminution du taux d'AIA, les éléments de cette étude permettent de suggérer, dans les organes aériens, l'installation d'un phénomène hyperauxinique. Cette situation hormonale pourrait être en partie responsable du ralentissement de taille observé. Afin de confirmer ces hypothèses, j'ai par la suite cherché à apprécier quantitativement les modifications du contenu en auxine des plants de Tomate traités.

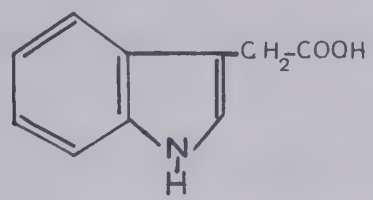
CHAPITRE III

MISE EN EVIDENCE D'UNE SITUATION HYPERAUXINIQUE CHEZ DES PLANTS DE TOMATE TRAITES PAR DES PRECURSEURS DU METABOLISME PHENOLIQUE

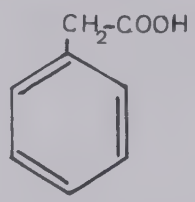
L'apport de différents précurseurs du métabolisme phénolique, acide quinique, phénylalanine, à de jeunes plants de Tomate, entraîne un ralentissement de croissance qui semble dépendre étroitement d'une production accrue en composés phénoliques.

Un certain nombre d'arguments indirects décrits dans le chapitre précédent suggèrent que, corrélativement à l'augmentation des teneurs en phénols, s'installe une situation hyperauxinique qui pourrait être à l'origine des différences de taille constatées.

Si l'acide β-indole acétique (AIA) est considéré comme l'auxine la plus répandue chez les végétaux, des travaux récents démontrent, en particulier chez la Tomate, que d'autres structures naturelles comme l'acide phénylacétique (APA) peuvent manifester des propriétés auxiniques (WIGHTMAN et RAUTHAN, 1974 ; SCHNEIDER et WIGHTMAN, 1974 ; GUDIN et HARADA, 1974). Ces recherches permettent de conclure à l'existence, chez certaines plantes, d'un ensemble de substances auxiniques comprenant au-delà des structures indoliques, des composés tels que l'APA.



Acide β-indole acétique



Acide phénylacétique

En ce qui concerne Lycopersicum esculentum Mill., espèce retenue dans cette étude, il a été montré récemment, en utilisant des tests biologiques, que l'APA isolé possédait des propriétés auxiniques moins nettes que l'AIA mais était présent dans ce végétal en quantité plus importante (SCHNEIDER et WIGHTMAN, 1974).

Dans ce chapitre, j'ai donc tout d'abord cherché à quantifier les variations du contenu en substances à activité auxinique (APA, AIA) chez des plants de Tomate traités.

A - METHODE DE DOSAGE DES SUBSTANCES AUXINIQUES

En raison de leur présence en quantité peu importante chez les végétaux, les substances de croissance ont pendant longtemps été estimées en utilisant des tests biologiques. Actuellement on s'oriente, de plus en plus, vers l'emploi de méthodes physicochimiques aussi sensibles que les tests biologiques mais plus spécifiques. Pour ma part, j'ai adopté cette démarche afin de déterminer chez Lycopersicum les teneurs en acide phénylacétique et β-indoleacétique.

Dans les deux cas, les substances auxiniques sont extraites par le méthanol à 4° C. L'extrait amené à sec est repris par de l'eau, et la suspension obtenue centrifugée afin d'éliminer les chlorophylles insolubles en milieu aqueux. Le surnageant est ensuite fractionné à différents pH (8,5 et 3) par extraction sélective à l'éther éthylique, selon le protocole de KNEGT et BRUINSMA (1973). La fraction éthérée "acide" est évaporée à sec et les molécules auxiniques dosées en utilisant les techniques suivantes :

- en ce qui concerne l'acide phénylacétique j'ai retenu la spectrophotométrie en lumière ultraviolette, après purification de ce composé par chromatographie sur colonne de Polyclar AT. Le protocole du dosage, adapté au laboratoire, a déjà été décrit en détail (DOUMENJOU, 1977) : en solution dans le solvant d'élution on peut doser l'APA à ses maxima d'absorption (228 et 260 nm) ; de plus, dans le cas d'un extrait végétal, la valeur du rapport $\frac{DO\ 228}{DO\ 260}$ comprise entre 4 et 5 fournit un critère de pureté du produit analysé.

- l'acide β-indole acétique a été dosé selon la méthode spectrophotofluorimétrique de KNEGT et BRUINSMA (1973), qui, par rapport aux autres techniques décrites dans la littérature (PEGG, 1976), présente à mon avis deux avantages essentiels :

  • spécificité : elle repose sur la détermination par spectrophotofluorimétrie d'un produit de transformation spécifique de l'AIA (STOESSL et VENIS, 1970), l'indole α pyrone (les maxima d'excitation et d'émission étant respectivement 450 et 480 nm).

• fiabilité : une surcharge en AIA radioactif introduite lors de l'extraction permet, au moment du dosage, d'évaluer les pertes subies en cours de purification.

De plus,cette méthode est très sensible puisqu'il est possible de déterminer des concentrations de l'ordre de 5 ng/ml.

Des développements concernant ces deux méthodes sont donnés en annexe (page 135).

B - MODIFICATIONS DU CONTENU EN SUBSTANCES A ACTIVITE AUXINIQUE LORS DE TRAITEMENTS PAR L'ACIDE QUINIQUE ET LA PHENYLALANINE

1.- Teneur en acide phénylacétique

Selon le schéma biogénétique de la figure 7 page 64, un apport de phénylalanine ou d'acide quinique pouvait se traduire par une synthèse accrue d'APA. J'ai donc comparé les teneurs en ce composé dans le cas de plants témoins et traités par ces deux précurseurs potentiels.

TABLEAU XIV

Dosage de l'acide phénylacétique après apport de phénylalanine 10^{-2} M (E1) et d'acide quinique 4×10^{-2} M (E2) (8 jours de traitement). Deux séries d'expériences ont été réalisées à partir d'extraits distincts du même échantillon

Traitements effectués	Ac. phénylacétique µg/g matériel sec	
	Exp. 1	Exp. 2
Témoin	20,3	20,5
E1 phénylalanine 10^{-2} M	11,5	11,0
E2 ac. quinique 4×10^{-2} M	35,8	36,0

Les résultats du tableau XIV montrent que l'apport d'acide quinique détermine une certaine augmentation des teneurs en acide phénylacétique. Dans ce cas, le composé fourni joue son rôle de précurseur (Figure 7, page 64).

En revanche, en ce qui concerne le traitement par la phénylalanine, aucune stimulation n'est décelée ; de plus, contrairement aux résultats escomptés, le fait d'augmenter le pool en phénylalanine du végétal entraîne une diminution des teneurs en acide phénylacétique. Pour expliquer cette observation, il faut admettre non seulement que dans les conditions retenues le composé apporté n'est pas

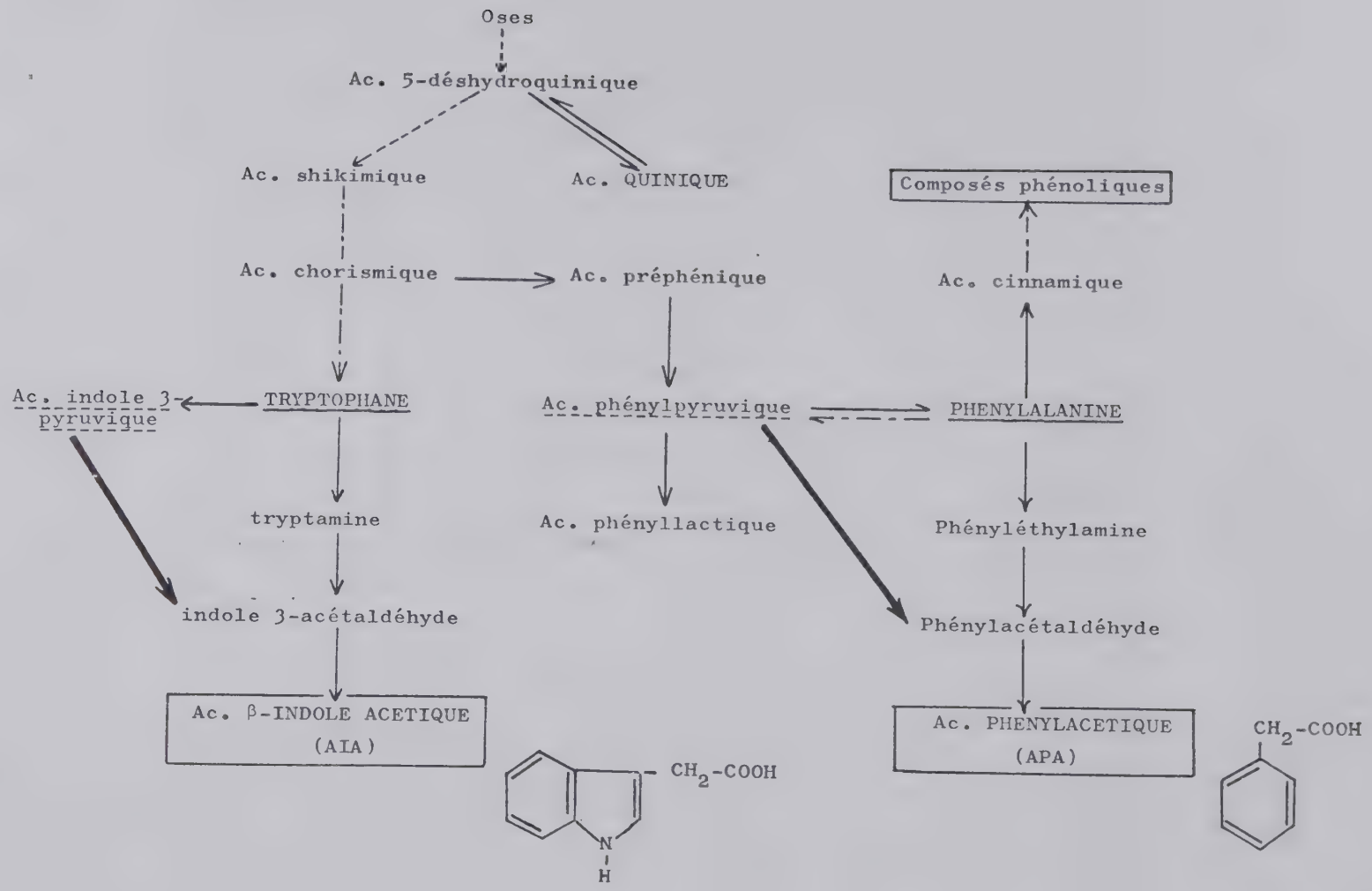


Figure 7 - Mode de formation des acides β-indole acétique et phénylacétique selon SCHNEIDER et WIGHTMAN (1974).

utilisé dans la chaîne de synthèse de l'APA, mais qu'il peut inhiber également certaines réactions situées en amont, et conduisant à la formation d'acide phénylpyruvique (Figure 7 page 64). Par analogie avec ce qui a été montré chez le Chêne (GADAL, 1970), cette inhibition par la phénylalanine pourrait concerner la chorismate mutase, enzyme catalysant la transformation de l'acide chorismique en acide préphénique (Figure 7).

2.- Teneur en acide β-indole acétique

Les déterminations réalisées précédemment montrent que l'APA ne paraît pas exercer un effet déterminant dans les modifications de croissance constatées : cette substance ne subit soit aucune stimulation (apport de phénylalanine) soit des variations trop faibles (acide quinique) pour expliquer l'installation d'une situation hyperauxinique (WIGHTMAN, communication personnelle). La diminution du taux d'APA, en présence de phénylalanine, pourrait cependant représenter un facteur du ralentissement de croissance constaté.

Par la suite, pour vérifier d'éventuelles modifications du taux d'AIA, j'ai dosé cette hormone dans des plants traités par des précurseurs du métabolisme phénolique. Pour les parties aériennes des individus témoins, on obtient, selon la technique retenue (Tableau XV), des valeurs sensiblement identiques à celles déterminées par différents auteurs chez ce végétal, suivant d'autres modes d'estimation : densitométrie après séparation par chromatographie sur couche mince (SCHNEIDER et al., 1972), test de croissance du coléoptile d'Avoine (PEGG et SELMAN, 1959 ; MATTA et GENTILE, 1964).

TABLEAU XV

Détermination des teneurs en AIA des parties aériennes de plants de Tomate après un traitement de 12 jours par une solution d'acide quinique (4×10^{-2} M) ou de phénylalanine (10^{-2} M). Les résultats correspondent aux valeurs obtenues lors de 2 expériences (1 et 2) à partir de lots distincts

Traitement effectué	AIA (ng/g de matériel sec)	
	Exp. 1	Exp. 2
Témoin	182	151
Acide quinique	1 430	1 350
Phénylalanine	1 310	1 126

En ce qui concerne les plants dont la teneur en phénols est stimulée, les résultats montrent effectivement qu'un apport d'acide quinique ou de phénylalanine entraîne, dans les parties aériennes

correspondantes, une forte augmentation de la teneur en auxine (Tableau XV). Cette réponse représente donc un élément commun aux deux types de traitements précités.

Les déterminations effectuées au niveau des différents organes, après apport d'acide quinique, font apparaître une accumulation de l'auxine dans les zones supérieures des parties aériennes de la plante (Tableau XVI) : les feuilles et les entrenoeuds renferment 6,1 et 7,9 fois plus d'auxine que les mêmes organes des plants témoins. Ce niveau d'accumulation s'atténue ensuite dans les hypocotyles (3,7) alors que dans les racines dont la croissance n'est pas modifiée, le taux auxinique est peu affecté (1,6). Ces observations suggèrent une corrélation entre l'accumulation de l'auxine et les modifications de croissance décelées au niveau des parties aériennes (MARIGO et BOUDET, 1978).

TABLEAU XVI

Teneurs en AIA de différents organes de plants de Tomate traités 12 jours par l'acide quinique (4×10^{-2} M)

Organes	AIA (ng/g de matériel sec)		Rapport E/T
	Témoin	Essai	
Feuilles	170	1 050	6,1
Entrenoeud	239	1 904	7,9
Hypocotyle	144	532	3,7
Racines	171	273	1,6

C - STIMULATION PHENOLIQUE ET HYPERAUXNIE : PHENOMENES RELIES OU INDEPENDANTS ?

A ce stade de la progression du travail, il ressort que les traitements par l'acide quinique et la phénylalanine donnent lieu à trois types de réponses qui ont été appréciées quantitativement :

- une stimulation des teneurs en composés phénoliques,
- une augmentation du taux d'AIA,
- une réduction de croissance.

Après avoir recensé ces différents événements, il s'agissait d'apprécier s'ils étaient associés par des relations de cause à effet ou s'ils étaient en partie indépendants.

En particulier, étant donné la fonction de précurseur potentiel de l'acide quinique vis-à-vis de l'AIA et d'un possible effet indirect de la phénylalanine -blocage de la chorismate mutase et orientation du flux carboné vers la formation de tryptophane- il convenait d'évaluer si l'hyperauxinie relevait :

- soit d'une biosynthèse accrue de l'AIA sous l'effet des molécules apportées (effet précurseur)
- soit de la stimulation des teneurs en composés phénoliques.

Pour tenter de répondre à cette question, j'ai envisagé deux approches :

- l'une a porté sur la détermination des pools de tryptophane (intermédiaire dans la synthèse de l'AIA) après apport d'acide quinique et de phénylalanine,
- l'autre a consisté à apprécier les variations des teneurs en AIA lors de traitements conduisant à une stimulation du pool en composés phénoliques mais ne pouvant être impliqués dans une modification de synthèse de l'AIA via un effet précurseur.

1.- Etude d'un effet direct (précurseur) de l'acide quinique et de la phénylalanine sur la synthèse de l'AIA

a - Méthode de dosage du tryptophane

Le tryptophane est déterminé selon le protocole de FRANK et De MOSS (1957) en mesurant ,en présence de pyridoxal phosphate, la quantité d'indole libérée après action de la tryptophanase. Le détail des différentes opérations est rappelé en annexe (page 133).

b - Résultats

A l'examen du tableau XVII, il ressort que le traitement par les deux types de précurseurs utilisés n'entraîne, en aucun cas, de différence significative dans les teneurs en cet acide aminé aromatique.

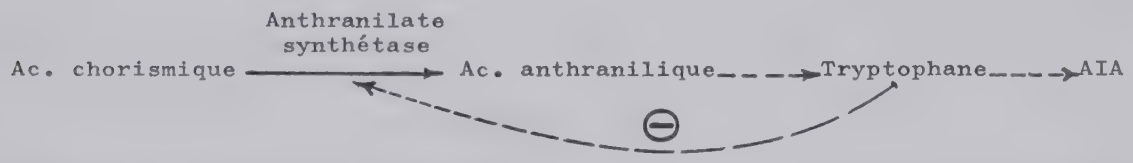
TABLEAU XVII

Détermination des teneurs en tryptophane des parties aériennes et des racines de Tomate après un traitement de 8 jours des plantules par des solutions de phénylalanine 10^{-2} M (E1) et d'acide quinique $4x10^{-2}$ M (E2)

Traitements effectués	Tryptophane (µg/g de matériel sec)	
	Parties aériennes	Racines
Témoin	61,9	28,6
E1 phénylalanine 10^{-2} M	61,9	30
E2 ac. quinique $4x10^{-2}$ M	59,2	28,6

Les déterminations effectuées à deux reprises à partir des mêmes échantillons ont conduit à des résultats comparables.

En ce qui concerne l'acide quinique ,ces résultats montrent qu'une régulation rigoureuse s'exerce en amont de l'étape de formation du tryptophane puisqu'aucune augmentation n'est décelée. Cette observation est à rapprocher des travaux de WIDHOLM (1974) indiquant qu'aucune variation significative de la teneur en tryptophane n'est perçue, lors d'un apport en acide shikimique, à des cultures de cellules. D'après cet auteur, le phénomène de rétroinhibition de l'anthranilate synthétase par le tryptophane jouerait un rôle important dans le contrôle de la teneur en ce composé.



Contrôle du taux de formation du tryptophane par rétroinhibition de l'anthranilate synthétase

En relation avec l'état hyperauxinique des plants traités, ces premières données semblent éliminer l'éventualité d'un effet précurseur direct des molécules apportées sur la synthèse d'AIA. Cependant, ce mode d'approche se réfère aux capacités d'accumulation, mais ne tient pas compte de la vitesse de métabolisation du tryptophane. Aussi, d'autres éléments apparaissent nécessaires pour infirmer un effet précurseur et justifier l'intervention des composés phénoliques dans les modifications des teneurs en auxine.

2.- Influence d'un apport d'acide cinnamique

J'ai tenté de confirmer cette intervention en estimant les teneurs en AIA de plants de Tomate traités par un précurseur direct du métabolisme phénolique, l'acide cinnamique qui ne présente aucune relation biogénétique avec l'AIA (Tableau XVIII).

Les résultats obtenus montrent que, dans les parties aériennes, ce composé conduit également à une augmentation du taux d'AIA ; cependant, comparativement aux essais effectués en présence d'acide quinique ou de phénylalanine, qui, pourtant, entraînent une augmentation comparable du taux en polyphénols solubles (Tableau XVIII, p. 69), la stimulation de la teneur en auxine est moins marquée.

TABLEAU XVIII

Effets de différents précurseurs du métabolisme phénolique sur la teneur en auxine et le contenu phénolique des parties aériennes de plants de Tomate. Les déterminations ont été réalisées après 12 jours de traitement

Traitements	AIA (ng/g mat. sec)	Phénols µMoles/g mat. sec
-	182	11,8
Ac. quinique $4x10^{-2}$ M	1 430	24,6
Phénylalanine 10^{-2} M	1 310	22,6
Ac. cinnamique $2x10^{-3}$ M	725	23,7

Ces différences peuvent être reliées à un effet toxique de l'acide cinnamique lui-même qui induit des symptômes beaucoup plus sévères au niveau de la croissance que les deux autres précurseurs.

La stimulation du contenu phénolique soluble, qui constitue une conséquence directe de l'apport des molécules des trois types de précurseurs utilisés, pourrait donc représenter le premier événement d'une série conduisant à une augmentation des teneurs en auxine.

3.- Appréciation de l'état auxinique de plants dont la teneur en phénols est stimulée

Créée artificiellement dans le cas précédent en apportant un précurseur du métabolisme aromatique, cette stimulation de la teneur en phénols représente une réaction courante des végétaux soumis à certains stress : malnutrition (BRZOZOWSKA et al., 1973), agressions parasitaires (FARKAS et KIRALY, 1962). Le plus souvent, ces augmentations du pool phénolique s'accompagnent aussi de modifications de croissance.

Pour deux situations de ce genre* (infection par Fusarium oxysporum -carences en bore) j'ai recherché, chez Lycopersicum, si la stimulation du pool phénolique s'accompagnait d'une augmentation des teneurs en auxine (Tableau XIX , page 70).

* Les plants qui subissent une carence totale en bore sont cultivés sur le milieu approprié défini par HOAGLAND et ARNON (1950). L'infection par Fusarium oxysporum a été réalisée selon des conditions déjà précisées (CARRASCO et al., 1977).

TABLEAU XIX

Estimation de la teneur en auxine dans les parties aériennes de plants de Tomate soumis, pendant 15 jours, à une infection par Fusarium oxysporum ou carencés totalement en bore. Les plants infectés ont été récoltés 30 jours après la mise en culture. Dans le cas des carences, les déterminations ont porté sur des plants âgés de 21 jours

	Infection par Fusarium		Carence en bore	
	T	Infecté	T	E
Teneur en AIA (ng/g mat. sec)	141	857	162	268

L'attaque par Fusarium oxysporum conduit simultanément, dans les parties aériennes, à une stimulation du pool phénolique (CARRASCO et al., 1978) et à une forte augmentation du taux d'auxine ; ces modifications des teneurs en AIA sont sensiblement identiques à celles déterminées pour la même association hôte-parasite par MATTA et GENTILE (1964) (10 µg à 120 µg par Kg de matériel frais). De même, mais à un degré moindre, les individus carencés en bore voient leur teneur en AIA augmenter.

Dans des situations aussi complexes, le stimulus initial entraîne un bouleversement profond des différentes capacités métaboliques du végétal et il est difficile d'aboutir à des généralisations. De plus, dans le cas particulier d'une infection fongique, la réponse enregistrée peut ne pas être entièrement la conséquence d'une action de l'hôte, certains champignons étant capables de synthétiser cette hormone in vitro en présence de tryptophane (MACE, 1965). Cependant, malgré ces restrictions, dans ces conditions particulières, il est possible, comme précédemment, d'associer les augmentations respectives des teneurs en phénols et en auxine chez Lycopersicum.

D - HYPERAUXINIE ET LIGNIFICATION

Après avoir apporté des arguments permettant de relier l'augmentation du taux d'AIA à la stimulation des teneurs en composés phénoliques solubles, il fallait expliquer l'effet des deux types de réponse sur la croissance du végétal.

Dans le chapitre II j'ai signalé, consécutivement au traitement, une importante élévation des teneurs en lignines. Leur mise en place

précoce dans la paroi pouvait intervenir en ralentissant l'élongation cellulaire. J'ai donc cherché à apprécier l'influence de l'AIA sur la synthèse des lignines et sur l'activité des peroxydases pariétales, enzymes impliquées dans la polymérisation des unités monomères précurseurs (SARKANEN et LUDWIG, 1971). Parallèlement, et à titre de "contre expérience", j'ai envisagé l'effet sur la lignification d'un apport exogène de gibberelline qui permet d'accélérer la croissance des plants témoins et d'atténuer le ralentissement de taille des individus traités.

1.- Méthodes expérimentales

a - Estimation du degré de lignification

L'intensité de la lignification a été estimée in situ par comptage des cellules lignifiées observables, après des colorations spécifiques, sur des coupes transversales effectuées au niveau de l'hypocotyle, un centimètre au-dessus du collet. Les différentes méthodes de caractérisation proposées dans la littérature (SARKANEN et LUDWIG, 1971) ayant toujours conduit à des résultats comparables, j'ai essentiellement retenu les colorations au phloroglucinol - HCl et au mélange carmin aluné - vert d'iode. Les déterminations effectuées représentent des valeurs moyennes obtenues à partir de 10 plants.

b - Détermination de l'activité peroxydase des parois

- Isolement des parois : Les parois sont obtenues selon un protocole adapté de celui de RIDGE et OSBORNE (1970) dont le principe consiste en l'élimination des constituants solubles dans différents milieux : tampon phosphate 0,1 M pH 7,2, Triton X 100 (2 %), H_2O, sel de sodium (NaCl M). Les parois sont ensuite lavées par H_2O, l'acétone et après séchage sous vide, conservées au froid.

- Mesure de l'activité peroxydase : Les parois (50 mg) sont mises en suspension sous agitation dans un milieu réactionnel composé de : 1,5 ml de guaïacol (0,5 %) et 1,5 ml d'H_2O_2 (à 2 volumes) dans le tampon phosphate 100 mM pH 6,0 préalablement porté à 30° C. Après un temps de contact de 1 mn on introduit 3 ml de cyclohexanone pour extraire le produit coloré formé. La phase organique est recueillie et son absorption mesurée à 470 nm. Des blancs appropriés (parois préalablement bouillies en suspension dans le milieu réactionnel) sont réalisés dans les mêmes conditions.

L'activité peroxydase est exprimée en unité pour 100 mg de matériel végétal sec, l'unité correspondant à une quantité d'enzyme provoquant une variation de DO de 0,1 à 470 nm pendant 1 mn.

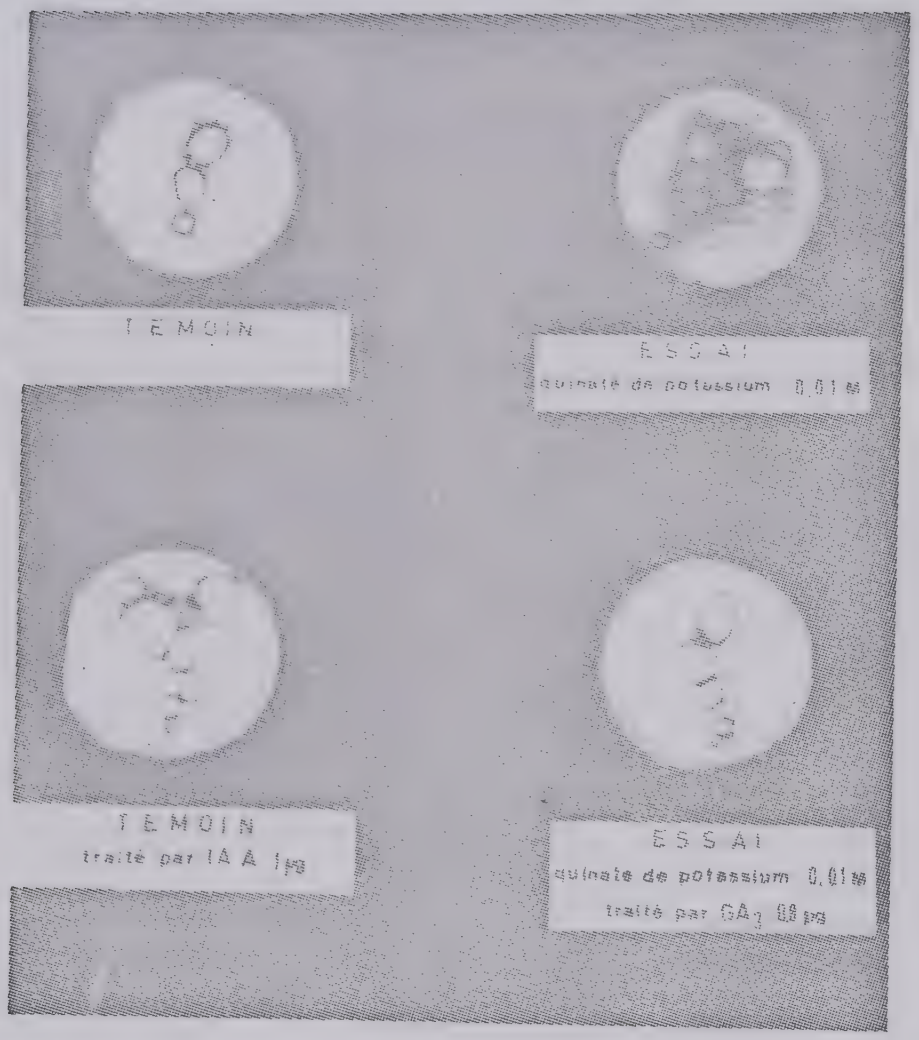


Planche 2

Comparaison du degré de lignification de plants cultivés dans les conditions normales (témoin), après application d'auxine (témoin traité par AIA 1 µg) de plants essais (acide quinique 0,01 M), de plants essais après apport d'acide gibberellique (essai traité par GA_3 0,8 µg).

2.- Résultats

L'effet des hormones est recherché,après avoir déposé celles-ci au niveau du bourgeon apical,aux concentrations minimales où elles manifestent une action négative (AIA) ou positive (gibberelline) sur la croissance. La planche 2 est une illustration des observations effectuées et le tableau XX donne le nombre moyen de cellules lignifiées par faisceau.

Comparativement aux témoins (T), l'auxine (T + AIA) entraîne, comme dans le cas d'un apport en acide quinique (E_{AQ}) une lignification plus importante. Par contre, les gibberellines (E_{AQ} + AG) interviennent en ralentissant le degré de lignification des individus dont la teneur en phénols est stimulée.

TABLEAU XX

Comparaison du degré de lignification et de l'activité des peroxydases pariétales de plants témoins (T), après application de 1 µg d'auxine (T + AIA), de plants essais traités par l'acide quinique 10^{-2} M (E_{AQ}) de plants essais après apport de 1 µg d'acide gibberellique (E_{AQ} + GA_3). Les deux hormones sont déposées en solution aqueuse avant le traitement quinique. Les déterminations de l'activité peroxydase ont été réalisées après 3 jours de traitement, l'estimation du nombre de cellules lignifiées au 5e jour

	T	T + AIA	E_{AQ}	E_{AQ} + GA_3
Nombre de cellules lignifiées	36 ± 3	84 ± 6	101 ± 8	31 ± 4
Activité peroxydasique en U.E./100 mg de matériel végétal sec	8,7	15,2	17,9	9,9

U.E. = unités enzymatiques.

En ce qui concerne l'intensité de la lignification, ces résultats conduisent à deux observations essentielles :

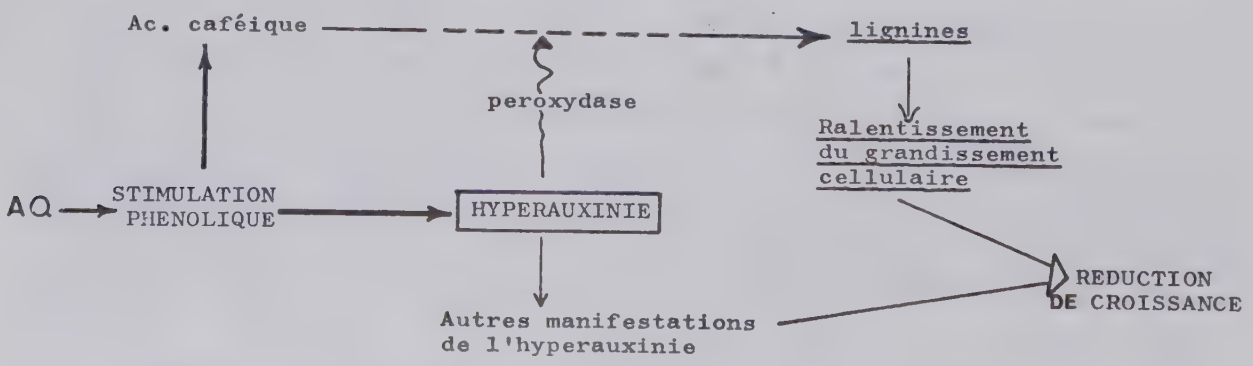
- existence d'une corrélation inverse entre lignification et croissance : à une augmentation de la lignification consécutive à l'apport d'acide quinique ou d'auxine correspond un ralentissement de l'allongement ; inversement, le fait de ralentir le processus de lignification des parois par un traitement avec des gibberellines permet de compenser en partie les modifications de taille des individus traités par l'acide quinique. Ces données suggèrent donc l'implication des structures lignifiées dans les modifications de l'allongement cellulaire.

- mise en évidence, indépendamment d'autres éléments de régulation, d'un contrôle hormonal de la lignification.

Ces observations sont confirmées par la mesure de l'activité des peroxydases pariétales. Après trois jours de traitement par l'acide quinique (E_{AQ}), avant que l'on ne puisse visualiser une augmentation de la lignification, on constate que l'activité peroxydase est très nettement stimulée dans les parois (Tableau XX). La même observation peut être relevée dans le cas d'un apport d'auxine à des plants témoins (T + AIA), alors que les gibberellines préalablement appliquées à des individus traités par la suite avec l'acide quinique (E_{AQ} + AG_3) empêchent l'expression de l'activité peroxydase de se concrétiser.

Au niveau des modifications de l'activité peroxydase, on retrouve donc des variations identiques à celles décrites précédemment concernant les lignines. Les formes pariétales de cette enzyme paraissent se comporter comme des éléments susceptibles de jouer un rôle de cibles vis à vis d'une action hormonale. En initiant la synthèse de nouvelles structures lignifiées sous l'action d'une élévation des teneurs en AIA, elles entraîneraient un prélèvement plus important des unités phénoliques précurseurs dont les teneurs sont par ailleurs stimulées par le traitement. L'acide chlorogénique, qui, chez la Tomate, assure une fonction de réserve (MARIGO et al., 1975) pourrait par exemple intervenir en alimentant cette voie par l'intermédiaire de la fraction aromatique de sa molécule.

Compte tenu des résultats obtenus concernant les interactions phénols - auxine et leurs répercussions dans la croissance, chez Lycopersicum, on peut imaginer le schéma hypothétique et vraisemblablement simplificateur suivant :



AQ = acide quinique

Dans cette séquence d'évènements, la situation hyperauxinique représente un maillon de première importance assurant le relais entre le stimulus initial (apport d'acide quinique) et la mise en place d'un métabolisme préférentiellement orienté vers la formation de lignines.

CONCLUSION ET DISCUSSION

Cette étude, entreprise pour préciser la nature de la situation hyperauxinique de plants de Tomate traités par des précurseurs du métabolisme phénolique, a permis de vérifier l'existence, dans ce matériel végétal, de deux substances de nature auxinique, l'AIA et l'APA. Plus récemment identifié en tant qu'hormone, l'APA manifeste les mêmes effets biologiques que l'AIA, mais à des concentrations supérieures (WIGHTMAN, 1977), ce qui peut expliquer sa présence en quantités importantes chez des végétaux, et plus particulièrement chez la Tomate.

En ce qui concerne le rôle éventuel plus particulier de ces substances lors de l'établissement de la situation hyperauxinique, la détermination de leurs teneurs après apport d'acide quinique et de phénylalanine montre que seul l'AIA, qui subit une forte stimulation dans les parties aériennes des plants traités, paraît concerné.

Différents arguments permettent d'associer la stimulation du conténu en auxine à la production accrue en polyphénols :

- en se référant au tryptophane qui ne subit aucune modification de ses teneurs après apport d'acide quinique et de phénylalanine, il semble que les molécules de précurseurs des composés phénoliques n'interviennent pas directement dans la synthèse de l'AIA,
- l'augmentation de la teneur en auxine s'observe également lorsqu'on traite les plants par un précurseur plus direct du métabolisme phénolique, l'acide cinnamique,
- enfin, bien que constituant une preuve indirecte, il est possible d'établir dans certaines conditions (carence en bore, infection fongique) une corrélation entre les deux événements chez ce végétal.

Les données présentées définissent donc une situation dans laquelle la stimulation du pool phénolique se répercute chez Lycopersicum par une augmentation des teneurs en auxine.

Comme dans le cas d'un apport exogène en AIA, la réduction de croissance des plants traités par des précurseurs du métabolisme phénolique serait alors directement reliée à l'élévation du taux en auxine endogène. Cet effet inhibiteur de l'auxine a souvent été signalé en relation avec l'allongement du système radiculaire ; cependant les modalités d'intervention de l'AIA demeurent encore actuellement

mal définies (SCOTT,1972) ; l'auxine pourrait agir directement, en ralentissant par exemple la phase d'élongation cellulaire, ou indirectement, en favorisant la production d'inhibiteurs endogènes (acide abscissique, éthylène,etc...).

Dans le cas des parties aériennes l'action de concentrations supraoptimales en AIA est plus rarement évoquée, et les mécanismes ne sont pas connus. Dans cette étude, les observations effectuées semblent démontrer des relations entre hyperauxinie, lignification et ralentissement de croissance :

- les plants dont la teneur en phénols et en auxine est stimulée présentent une lignification accrue et une réduction de taille comparables à celles des individus uniquement traités par l'AIA exogène.
- à l'opposé,les gibberellines qui agissent en compensant le ralentissement de l'allongement des organes aériens,s'opposent à la mise en place du polymère phénolique dans les cellules du xylème.

L'intervention des structures lignifiées en tant qu'élément mécanique empêchant le grandissement cellulaire n'a été,à ma connaissance,que peu suggéré. Pour qu'une telle hypothèse soit fondée, il semble que le processus doive affecter les cellules des différentes assises et particulièrement, dans ce cas précis, celles de l'épiderme pour lesquelles il est possible de caractériser une diminution de taille. Or, les observations histologiques montrent que la stimulation de la lignification concerne essentiellement les vaisseaux du xylème. Pour les cellules des autres assises dont la finalité n'est pas de se différencier en éléments lignifiés, il est possible que de faibles modifications,peu accessibles en raison de la sensibilité de la technique retenue, suffisent à provoquer un ralentissement de l'élongation. D'autre part, il n'est pas exclu qu'au sein des tiges les axes du xylème,en exerçant une tension accrue,entravent de proche en proche l'extension des cellules contigües.

Dans un processus aussi intégré que la croissance végétale, l'étape de lignification ne représente seulement qu'un élément des diverses composantes susceptibles de réguler le phénomène ; au-delà d'une implication des lignines, il est donc vraisemblable qu'en relation directe avec la stimulation des teneurs en composés phénoliques ou par l'intermédiaire de l'augmentation du contenu en AIA, d'autres événements soient également concernés dans les modifications constatées.

Les résultats présentés démontrent l'intervention des composés phénoliques dans l'installation d'une "situation hyperauxinique" chez Lycopersicum esculentum. Ce système expérimental défini dans le cas de plants intacts se prêtant à une approche des mécanismes régissant la nature des relations phénols - auxine (dans le sens d'une hyperauxinie), j'ai, dans la suite de mon travail, abordé ce problème en insistant sur deux points particuliers :

- recherche d'une intervention des phénols en tant que "protecteurs" d'auxine,
- rôle éventuel joué par ces composés dans le transport polarisé de l'AIA.

DEUXIEME PARTIE

MECANISMES D'ACTION DES COMPOSES PHENOLIQUES DANS LES MODIFICATIONS DU CONTENU AUXINIQUE

CHAPITRE I

INTERVENTION DES COMPOSES PHENOLIQUES EN TANT QUE PROTECTEURS D'AUXINE

CHAPITRE II

COMPOSES PHENOLIQUES ET TRANSPORT POLARISE DE L'AUXINE

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES

CHAPITRE I

INTERVENTION DES COMPOSES PHENOLIQUES EN TANT QUE PROTECTEURS D'AUXINE

A - METHODES EXPERIMENTALES

1.- Mesure des transformations de l'AIA ^{14}C "in vivo"

L'AIA 2-^{14}C (34,4 mCi/mmol, C.E.A) en solution aqueuse est apporté à de jeunes plants (5 µl avec une microseringue de Marburg) au niveau d'une section réalisée en dessous du bourgeon apical ou à la base de l'hypocotyle. L'auxine radioactive non utilisée est estimée après isolement selon le protocole retenu pour le dosage (voir Annexe, page 135). La purification finale est effectuée par chromatographie sur papier Whatman N° 3, dans le mélange solvant isopropanol - NH_4OH 8 N (80-20 V/V) (GOOD et al., 1956) en présence d'AIA inerte "entraîneur". Le composé est identifié en lumière ultraviolette et sa radioactivité mesurée, après élution du chromatogramme, au spectromètre à scintillation Packard (modèle 22-11).

2.- Obtention et purification d'enzymes oxydasiques

L'extraction des enzymes a porté sur du matériel frais.

a - Extraits "bruts"

Le milieu d'extraction est constitué par du tampon phosphate mono-bipotassique 20 mM de pH 6,5, contenant de l'EDTA (5×10^{-3} M). Après filtration de la suspension sur gaze, les extraits sont centrifugés 10 minutes à 35 000 x g, et les surnageants utilisés pour mesurer les activités d'extraits "bruts".

b - Extraits "purifiés"

Ces derniers sont préparés en ajoutant au milieu d'extraction précédent du PEG 6 000 (0,5 %), du Polyclar (500 mg pour 5 g de matériel frais), ainsi que dans certaines expériences, de la thiourée (1 %) qui inhibe l'activité polyphénoloxydase (MACHACKOVA et al., 1975). Les protéines solubilisées sont précipitées à pH 7,5, en amenant la concentration en sulfate d'ammonium dans le milieu à 80 % de la saturation. Le culot, obtenu après 10 minutes de centrifugation à 35 000 x g, est repris par du tampon phosphate 20 mM pH 6,5 renfermant de l'EDTA (5×10^{-3} M), puis dessalé par passage sur une colonne de Sephadex G 50 équilibrée dans le même tampon.

3.- Mesure des activités oxydases

- L'activité AIA oxydase est déterminée par colorimétrie (PILET, 1957) en estimant la quantité d'AIA non dégradée, ou par spectrophotométrie (LESCURE, 1970) en suivant l'apparition à 250 nm du 3-méthylène oxindole. Dans les deux cas, l'extrait enzymatique "brut" ou "purifié" est ajouté à un milieu réactionnel de composition suivante : AIA ($1,5 \times 10^{-4}$ M), $Mn\ Cl_2$ (10^{-4} M), 2,4 dichlorophénol (3×10^{-5} M) ou acide p-coumarique (7×10^{-5} M) les différents éléments étant en solution dans le tampon Mac ILVAINE de pH 4,5. La réaction s'effectue à l'obscurité à 30° C. Dans certaines expériences, la peroxydase commerciale (Horse radish peroxydase, SIGMA Type II) est utilisée à la concentration de 0,1 µg/ml.

L'unité d'activité AIA oxydase est définie comme la quantité d'enzyme transformant 1 µMole de substrat pendant les premières 60 minutes d'incubation.

- La dégradation de l'acide chlorogénique par la peroxydase commerciale, en présence d'AIA, de $Mn\ Cl_2$ et d'acide p-coumarique utilisés aux concentrations précédentes, est appréciée en suivant la diminution d'absorption dans l'UV à 320 nm. Avec l'enzyme végétale et H_2O_2 (2×10^{-7} M) comme cofacteur, on mesure à 265 nm la formation des produits d'oxydation de l'o-diphénol.

4.- Extraction, identification et dosage des composés phénoliques

a - Obtention des extraits phénoliques

Le matériel végétal sec (100 mg), réduit à l'état de poudre, est dépigmenté à plusieurs reprises (3 x 20 ml) par l'éther de pétrole (35-50° C) contenant 1 % de méthanol, puis extrait successivement à froid et sous azote par du méthanol (3 x 10 ml) et du tampon phosphate mono-bipotassique 20 mM, pH 6,5 (2 x 5 ml). Les extraits, réunis ou non, sont amenés à sec sous vide et le résidu repris par 10 ml de tampon phosphate 20 mM de pH 6,5. Pour apprécier l'intervention des phénols, les extraits sont éventuellement débarrassés de ces composés par passage sur Polyclar selon un protocole déjà décrit (MARIGO, 1973).

b - Fractionnement par filtration moléculaire

Les extraits précédents sont fractionnés sur colonne de Sephadex G 25, équilibrée dans le tampon phosphate 2 mM de pH 6,5 et préalablement étalonnée par un mélange de molécules standard pour filtration sur gel (Pharmacia, Uppsala Suède).

c.- Identification des phénols

Les composés phénoliques sont identifiés par chromatographie bidimensionnelle sur papier Whatman N° 3 en se référant aux données de TRONCHET (1969). Les produits d'oxydation de l'acide chlorogénique, après chromatographie descendante dans le mélange solvant butanol - acide acétique - H_2O (6-1-2 V/V), sont caractérisés par examen en lumière ultraviolette ou par pulvérisation du réactif à la paranitraniline diazotée (SWAIN, 1953).

d.- Méthodes de dosage

Les composés phénoliques, considérés globalement et l'acide chlorogénique, élué des chromatogrammes, sont dosés par le réactif de Folin et Ciocalteu selon le protocole détaillé dans le chapitre I (Première Partie).

B - MISE EN EVIDENCE D'UN RALENTISSEMENT DE LA DEGRADATION DE L'AUXINE CHEZ DES PLANTS DE TOMATE TRAITES PAR L'ACIDE QUINIQUE

1.- Etude de l'utilisation de l'AIA ^{14}C in vivo

J'ai comparé le devenir de l'auxine ^{14}C chez des individus traités ou non par l'acide quinique en mesurant, après des temps variables, la radioactivité de l'AIA non transformé.

TABLEAU XXI

Etude du devenir de l'AIA ^{14}C. L'expérience a porté sur les parties aériennes et les racines de plantes de 20 jours témoins (T) ou traitées par l'acide quinique 4×10^{-2} M (8 jours) ; à ce stade, ces dernières ne présentent que de légères modifications de taille par rapport aux plantes témoins. Pour les parties aériennes, les résultats représentent des valeurs moyennes obtenues à partir de deux expériences différentes

Durée de l'expérience (h)	Radioactivité de l'AIA non utilisé (dpm/plant)			
	Parties aériennes		Racines	
	T	E	T	E
0	133 000	133 000	206 965	206 965
1	-	-	55 461	170 709
3	9 782	70 940	33 582	105 322
5	8 413	23 531	28 631	78 036
7	7 167	17 864	-	-

Les résultats obtenus (Tableau XXI) montrent, pour les témoins, une utilisation rapide de l'AIA chez Lycopersicum esculentum, puisque après 3 heures, on ne retrouve que 7,3 % de la radioactivité apportée pour les parties aériennes, 16 % dans le cas des racines.

En ce qui concerne les plants dont la teneur en phénols est stimulée, l'AIA est beaucoup moins vite utilisé. Dans les parties aériennes où le traitement détermine une forte augmentation de la teneur en AIA endogène (celle-ci est 8 fois plus importante dans les plants traités), ces différences pouvaient provenir d'une dilution du précurseur radioactif au sein du "pool" endogène. Cependant, on assiste également à un net ralentissement dans l'utilisation de l'AIA au niveau des racines (Tableau XXI), alors que dans ces organes le taux en AIA est seulement multiplié par un facteur 1,5.

Le niveau d'accumulation des formes combinées de l'AIA ne paraissant pas affecté par le traitement (DOUMENJOU, 1977), ces observations suggéraient une limitation de la dégradation de l'auxine libre. Afin d'apporter des précisions, j'ai examiné par la suite l'incidence du traitement sur l'activité AIA oxydase, enzyme responsable de la destruction oxydative de l'auxine.

2.- Comparaison des activités AIA oxydases dans différents organes de plants témoins et traités par l'acide quinique

L'activité de l'enzyme a été mesurée séparément sur les différents organes du végétal témoin ou soumis au traitement quinate (Tableau XXII).

TABLEAU XXII

Distribution de l'activité AIA oxydase dans des extraits "bruts" de différents organes de plants témoins (T) et essais (E) traités 8 jours par l'acide quinique 4×10^{-2} M. Deux séries d'expériences distinctes ont été réalisées avec des résultats identiques. Les valeurs mentionnées correspondent à une expérience particulière

	Activité AIA oxydase en U.E./g de matériel végétal frais			
	Feuilles	Entrenoeuds	Hypocotyles	Racines
T	traces	10,3	108,3	87,8
E	traces	6,8	17,1	19,4

U.E. : unités enzymatiques

Les déterminations, effectuées sur des extraits "bruts", montrent une diminution du niveau d'activité AIA oxydase chez les plants traités et cela quel que soit l'organe considéré. Difficilement appréciable dans les feuilles et les entrenoeuds où l'enzyme est peu représentée, cette différence se manifeste ensuite de manière très importante

dans les hypocotyles (diminution par un facteur 6,3) et à un degré moindre dans les racines (facteur 4,5).

A la suite de ces résultats, il semble donc que le traitement par l'acide quinique entraîne une diminution du niveau d'activité AIA oxydase. Je me suis intéressé de manière plus approfondie aux modifications de cette activité en recherchant, par la suite, quelle pouvait être l'incidence de la stimulation en composés phénoliques sur le processus de dégradation de l'auxine.

C - ETUDE DES INHIBITEURS DE L'AIA OXYDASE

1.- Existence d'inhibiteurs phénoliques de l'AIA oxydase

Pour cette étude, j'ai retenu les hypocotyles et les racines qui présentent une activité suffisamment élevée.

Avec des extraits "bruts" de plants essais, l'étude de la cinétique de la réaction enzymatique permet de relever l'existence d'un "retard" dans l'oxydation de l'AIA, aussi bien dans les hypocotyles (45 minutes) que dans les racines (20 minutes) (Fig. 8 A, p. 86). De plus, lorsque les réactions débutent, les vitesses sont toujours inférieures à celles des témoins correspondants, phénomène particulièrement net dans les racines.

La purification de ces mêmes extraits permet, d'une part d'éliminer le temps de latence, d'autre part de diminuer le degré d'inhibition relevé précédemment pour les plants traités (Fig. 8 B, p.86). Il semble que, dans les extraits "bruts" essais, l'on soit en présence de composés exerçant deux types d'effets distincts :

- un retard dans la dégradation de l'AIA (temps de latence),
- une inhibition de l'activité AIA oxydase (réduction de la vitesse).

Afin de préciser l'intervention éventuelle des composés phénoliques, j'ai ajouté à une préparation d'AIA oxydase (purifiée à partir d'hypocotyles non traités) différents extraits "méthanoliques" issus de plants témoins ou traités (acide quinique 4×10^{-2} M) et comparé leur pouvoir inhibiteur.

Les résultats présentés sur la figure 9 (page 87) font apparaître plusieurs points :

- quelle que soit leur origine, les extraits témoins et essais quinate déterminent une inhibition de l'activité AIA oxydase, nettement plus marquée cependant, dans le cas des individus traités,
- à concentration égale, seul l'extrait de plants dont la teneur en phénols est stimulée entraîne l'apparition d'un temps de latence lors de l'oxydation de l'auxine,

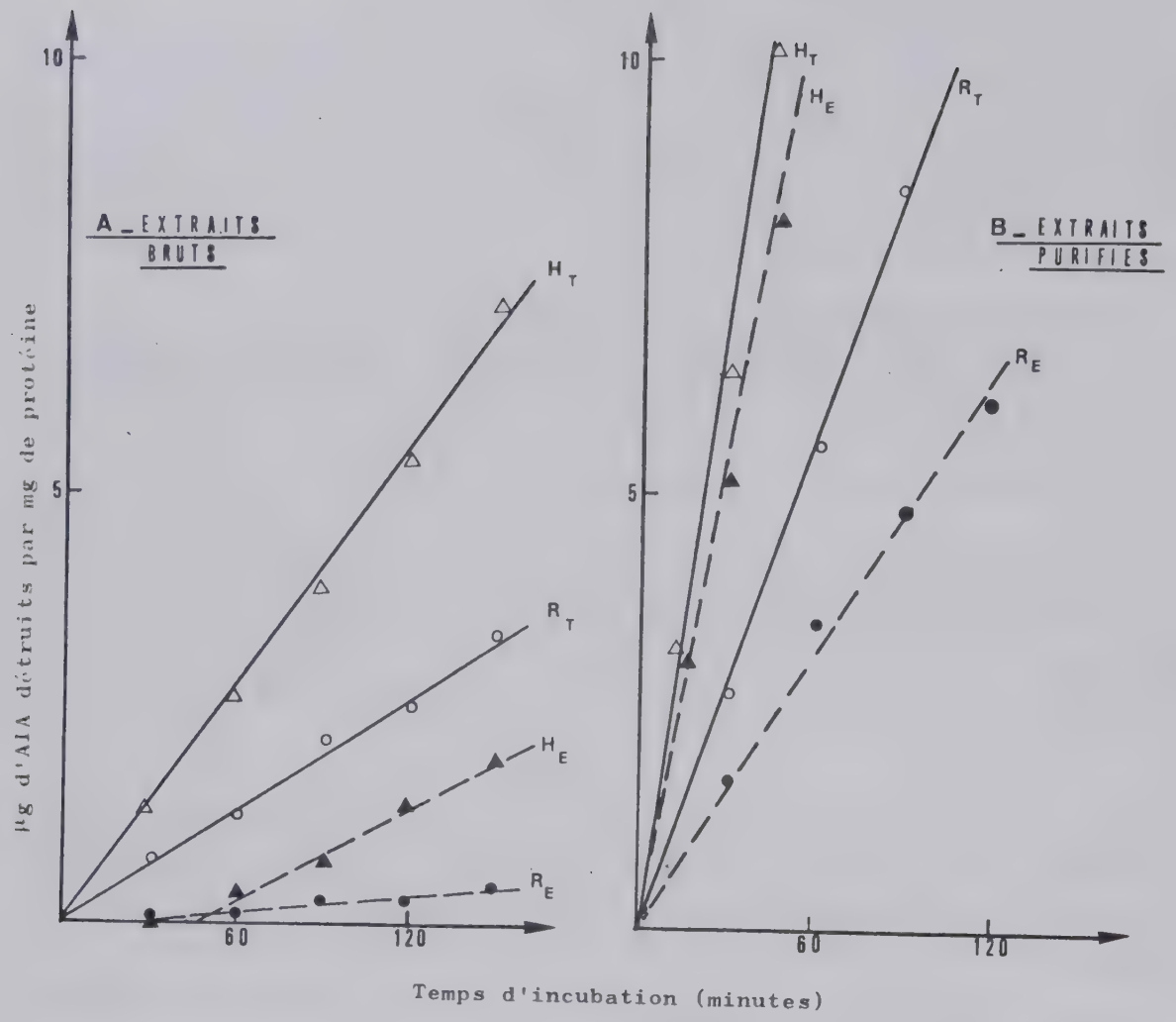


Figure 8 - Cinétiques de destruction de l'AIA par des extraits "bruts" (A) ou "purifiés" (B) issus d'hypocotyles (H) et de racines (R) de plants témoins (T) ou traités (E) 8 jours par l'acide quinique 4×10^{-2} M. Les différents extraits ont été préparés à partir des mêmes quantités de matériel végétal frais.

Abréviations : H_T : hypocotyles témoins
H_E : hypocotyles essais
R_T : racines témoins
R_E : racines essais

- les deux effets inhibiteurs relèvent bien de l'action des phénols car l'extrait essai ,débarrassé de ces derniers par passage sur Polyclar,ne provoque aucune modification.

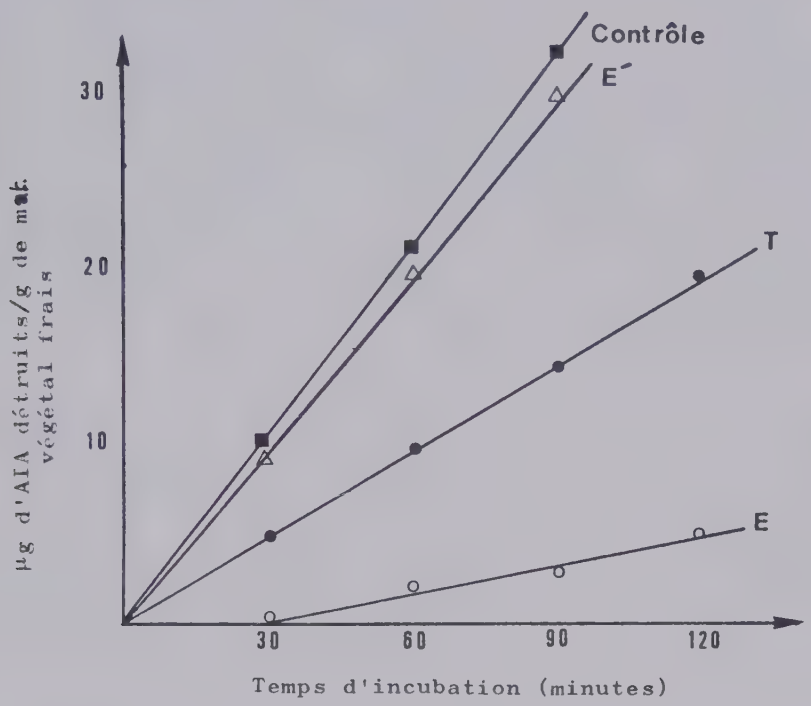


Figure 9 - Effet sur l'activité AIA oxydase d'extraits obtenus à partir de quantités identiques de matériel témoin (T) et essai avant (E) et après passage sur Polyclar (E'). Dosage de l'AIA oxydase selon la méthode de PILET. Addition de 0,1 ml d'extrait végétal au temps 0 de la réaction. Dans le contrôle, l'extrait est remplacé par un volume identique de tampon phosphate 20 mM de pH 6,5.

Selon cette approche, on retrouve donc les deux types d'effets constatés précédemment et on confirme l'intervention des polyphénols dans les modifications de l'activité AIA oxydase. J'ai seulement tenté de caractériser les substances responsables du "retard" dans l'oxydation de l'AIA, l'effet "inhibiteur" pouvant correspondre aux propriétés aspécifiques des polyphénols qui se manifestent vis à vis de nombreux biocatalyseurs.

2.- Identification des inhibiteurs de type protecteur d'auxine

J'ai recherché dans des extraits obtenus à partir de plants traités par l'acide quinique (4×10^{-2} M) la nature des composés impliqués dans le retard de la dégradation de l'AIA, qui, par référence à la terminologie de YONEDA et STONIER (1967),ont été désignés sous le terme général de protecteurs d'auxine. La présence de ces composés est appréciée en déterminant l'importance du temps de latence

lors de l'oxydation de l'AIA. Les résultats d'extractions sélectives font apparaître que les protecteurs sont solubilisés dans le méthanol. Après purification sur colonne de Sephadex G 25, on les retrouve dans une fraction correspondant à des substances de faible masse moléculaire. Parmi les produits séparés dans une étape ultérieure par chromatographie bidimensionnelle, trois seulement ont provoqué un retard dans la dégradation de l'auxine : il s'agit des acides chlorogénique, néo-chlorogénique et d'un composé non identifié, présentant cependant des caractéristiques chromatographiques et spectrales (ultraviolet) analogues aux esters de type caféique. Quoique possédant les mêmes propriétés il semble, pour les stades d'étude retenus, que les polyphénols concernés ne soient pas de nature identique à ceux décrits par STONIER et al. (1970).

L'acide chlorogénique existe naturellement chez Lycopersicum et j'ai montré que l'apport d'acide quinique (4×10^{-2} M) stimule préférentiellement sa biosynthèse; lorsqu'après 8 jours de traitement le pool en composés phénoliques est multiplié par un facteur 2, l'acide chlorogénique voit ses teneurs triplées. Cette augmentation du taux de l'ortho- diphénol se manifeste dans les différents organes (Tableau XXIII) et est particulièrement nette au niveau des hypocotyles (facteur 6) où, inversement, l'activité AIA oxydase est la plus affectée par le traitement. A une élévation du taux en acide chlorogénique correspond une inhibition marquée de l'activité AIA oxydase. Cette corrélation inverse, particulièrement significative dans les hypocotyles où, dans les conditions normales, l'enzyme présente sa plus forte activité, suggère l'intervention particulière du diphénol dans le contrôle de la dégradation de l'auxine.

TABLEAU XXIII

Activité AIA oxydase (extraits "bruts") et teneurs en acide chlorogénique dans différents organes de plants témoins (T) et traités 8 jours par l'acide quinique (E)

	AIA oxydase (U.E/mg de protéines)		Ac. chlorogénique (µg/100 mg de matière sèche)	
	T	E	T	E
Entrenoeuds	1,7	1,0	98	140
Hypocotyles	16,1	2,5	10	62
Racines	7,7	1,2	23	48

U.E. = unités enzymatiques.

3.- Etude du mode d'action de l'acide chlorogénique en tant que protecteur d'auxine

A partir d'une préparation d'AIA oxydase d'hypocotyles de Tomate (extrait "purifié") ou en utilisant la peroxydase du Raifort (HRP), on peut caractériser, en présence d'ions manganèse (10^{-4} M) et d'acide p-coumarique (7×10^{-5} M), la formation de produits de dégradation de l'AIA absorbant à 250 nm et, en particulier, le 3-méthylène oxindole (LESCURE, 1970). L'acide chlorogénique (origine commerciale) introduit dans le milieu précédent en présence d'un extrait enzymatique végétal, induit l'apparition d'un temps de latence dont la durée augmente en fonction de la concentration en effecteur. Comme pour l'acide férulique (GELINAS, 1973), on relève une relation linéaire entre la concentration en acide chlorogénique et le logarithme du temps de latence.

Je me suis intéressé au devenir de l'acide chlorogénique pendant la période précédant la dégradation de l'auxine. L'examen de la figure 10 permet de remarquer que le diphénol est lui-même transformé par la peroxydase du Raifort car on observe une diminution rapide de l'absorbance à 320 nm (zone correspondant à son maximum d'absorption).

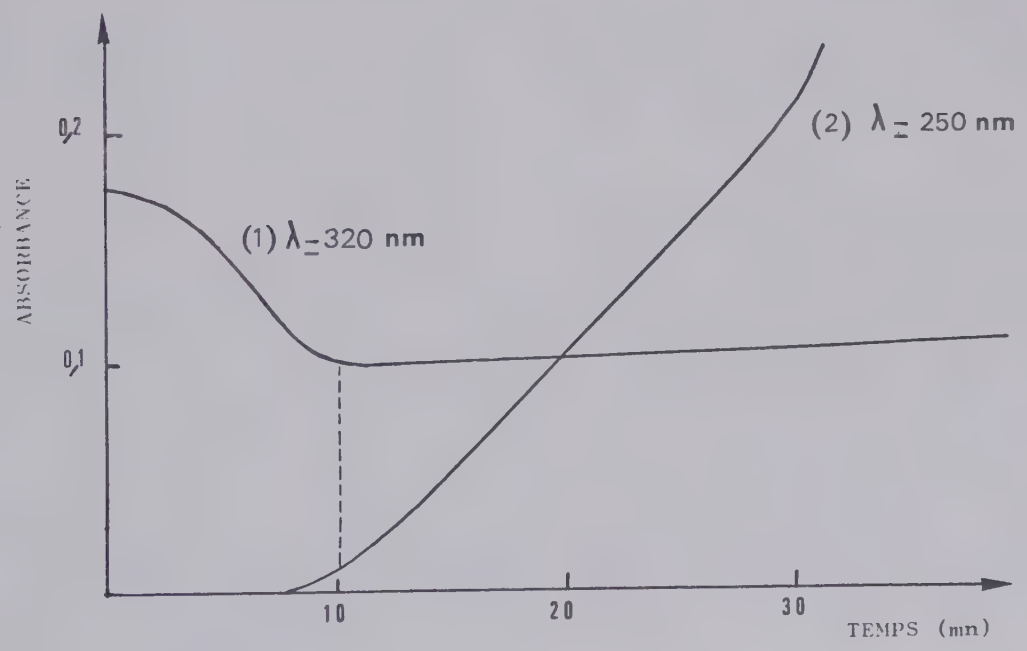


Figure 10 - Comparaison des cinétiques d'oxydation des acides chlorogénique (1) et β-indolyl-acétique (2) lors de l'action de la peroxydase commerciale sur un mélange des deux composés.

Consécutivement à cette période de transformation, on peut caractériser une augmentation d'absorbance à 250 nm due à l'apparition des produits d'oxydation de l'AIA. L'intervention séquentielle des deux processus démontre que l'oxydation de l'AIA ne peut débuter qu'une fois l'acide chlorogénique dégradé.

Avec l'enzyme d'origine végétale, la méthode spectrophotométrique précédente ne permet pas l'étude simultanée des deux types de réactions. Dans ce cas cependant, il est possible de caractériser par chromatographie sur papier (Tableau XXIV) des produits d'oxydation de l'acide chlorogénique identiques à ceux qui se forment dans les conditions précédentes. Par ailleurs, l'identification de certains d'entre eux, en quantités plus importantes dans les plants traités, suggère une utilisation plus marquée de l'o-diphénol par les enzymes d'oxydation.

TABLEAU XXIV

Caractérisation des produits d'oxydation de l'acide chlorogénique après chromatographie dans le mélange solvant butanol - acide acétique - eau (6-1-2 V/V)

Composés	Rf	Révélation à la p-nitraniline	Comportement en lumière ultra-violette	λ max. en solution aqueuse(nm)
Ac. chlorogénique	0,53	Jaune or	Fluorescent bleu ciel	250,300,325
I	0,01	Brun	Abs.	218,265,325
II	0,05	Brun	Abs.	222,285,325
III	0,12	Brun	Fluorescent jaune	-
IV	0,24	Brun	Fluorescent jaune	215,285,310

Chez les végétaux, l'oxydation de l'acide chlorogénique s'effectue par l'intermédiaire de systèmes à activités phénol oxydase (PPO) ou peroxydase. Avec la peroxydase commerciale ou en utilisant une préparation enzymatique végétale dépourvue d'activité PPO (thiourée), cette dégradation s'effectue si le milieu renferme H_2O_2 (2×10^{-7} M). Par contre, en l'absence d'H_2O_2, la destruction du diphénol par HRP nécessite non seulement la présence d'ions Mn^{2+} (10^{-4} M) et d'acide p-coumarique (7×10^{-5} M), mais aussi d'AIA qui jouerait le rôle de cofacteur. Des résultats identiques ont été obtenus en ce qui concerne l'oxydation de l'acide férulique par différents auteurs (GELINAS, 1973; MACHACKOVA et al. , 1975) qui, s'appuyant sur le fait que la catalase n'inhibe pas les oxydations ultérieures, proposent d'attribuer à l'auxine un rôle dans la formation d'un complexe enzyme - H_2O_2 .

Par analogie avec ces données, on peut penser que l'enzyme ainsi "activée" interviendrait ultérieurement selon des réactions de peroxydation classiques dans la transformation des deux types de substrats (Figure 11).

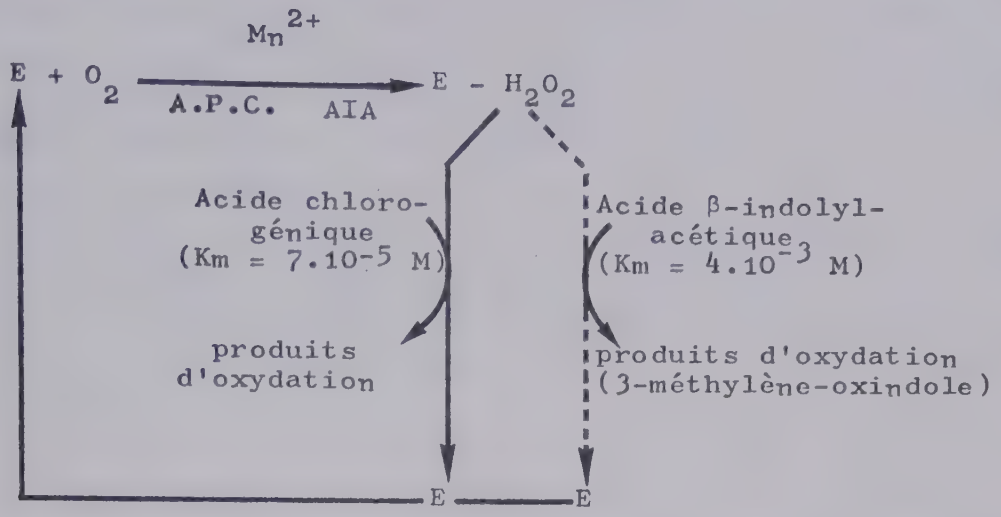


Figure 11 - Schéma pouvant illustrer les interactions des acides chlorogénique et β-indole acétique vis-à-vis de la peroxydase en l'absence d'H_2O_2 (APC = ac. p-coumarique).

L'étude des Km apparents lors de la dégradation de l'AIA en présence de concentrations variées en acide chlorogénique montre que le composé dihydroxylé peut être considéré comme un inhibiteur compétitif du système AIA oxydase. Des résultats identiques ont pu être établis chez le Pois (RABIN et KLEIN, 1957) ou à partir de racines de Lentille (PILET, 1964).

Nous avons déterminé l'influence des concentrations en AIA et en acide chlorogénique sur leur vitesse d'oxydation respective. En utilisant un extrait enzymatique d'origine végétale (sans activité PPO et avec H_2O_2 comme cofacteur dans le cas de la dégradation du diphénol) on obtient, selon la représentation en double inverse de LINEWEAVER et BURK, des valeurs de Km de 4×10^{-3} M pour l'AIA, 7×10^{-5} M pour l'acide chlorogénique. En ce qui concerne l'AIA cette valeur est proche de celle signalée par MACHACKOVA et al. (1975) : $2,3 \times 10^{-3}$ M pour des germinations de Blé. Chez Lycopersicum, le système d'oxydation aurait une affinité environ 57 fois plus importante pour l'acide chlorogénique, ce qui expliquerait l'oxydation préférentielle du diphénol.

CONCLUSION

Chez des plants de Tomate, un traitement par l'acide quinique qui détermine une augmentation du contenu phénolique entraîne un ralentissement de la dégradation de l'AIA. Des expériences effectuées in vitro montrent que les composés phénoliques du végétal interviennent en contrôlant la phase de dégradation : l'acide chlorogénique, dont la teneur est stimulée préférentiellement durant les premiers stades du traitement, semble jouer un rôle protecteur en retardant in vitro l'oxydation enzymatique de l'AIA. Au cours de ces interactions, le composé phénolique se comporte comme un inhibiteur compétitif de l'auxine. Cependant, comme cela a été montré pour la quercétine (BARZ, 1977) ou l'acide férulique (GELINAS, 1973), il ne doit pas être considéré comme inhibiteur au sens large mais plutôt comme un substrat plus efficace. En raison de son affinité supérieure pour le diphénol, l'enzyme oxyde celui-ci préférentiellement, la dégradation de l'AIA se déroulant ultérieurement.

Comme toute approche in vitro, ces différentes interprétations doivent être nuancées, car au niveau intracellulaire un certain nombre de notions doivent être prises en considération. Ainsi, les phénomènes de compartimentation, en créant un microenvironnement particulier, interviennent directement en empêchant ou en favorisant, selon le cas, le contact entre substances susceptibles de réagir entre elles. Une meilleure connaissance des interactions entre le métabolisme de l'auxine et celui des phénols nécessiterait des précisions sur la localisation des diverses réactions impliquées.

Faute de pouvoir aborder ce problème, j'ai cependant, dans ce travail, essayé d'apporter des arguments pour valider, in vivo, le rôle de l'acide chlorogénique comme "protecteur" d'auxine :

- l'étude comparée du devenir de l'AIA ^{14}C fait ressortir in vivo que l'auxine est moins vite transformée dans le cas des plants dont la teneur en phénols est stimulée ;
- il s'avère qu'une corrélation étroite existe entre l'inhibition de la dégradation de l'AIA et l'augmentation de la teneur en acide chlorogénique consécutive au traitement ;
- en retardant la destruction de l'auxine, l'acide chlorogénique est lui-même dégradé. Or, in vivo, on peut caractériser en quantités plus importantes dans les plants traités la présence de produits d'oxydation.

Ce mode d'intervention de l'acide chlorogénique a déjà été évoqué à de nombreuses reprises dans la littérature : le diphénol

qui ralentirait la dégradation de l'AIA ^{14}C en inhibant l'AIA oxydase (ZENK et MULLER, 1963 ; TOMASZEWSKI, 1964 ; RUNKOVA et al., 1972), déterminerait une augmentation de la teneur en auxine (PILET, 1964) et manifesterait de la sorte une action synergique avec l'AIA dans de nombreux tests d'élongation (TOMASZEWSKI et THIMANN, 1966). C'est à ce type d'action que l'on se réfère par ailleurs pour expliquer l'action favorable de l'acide chlorogénique sur diverses phases du développement (PAULET, 1966, PAUPARDIN, 1972).

Chez Lycopersicum, à la différence des travaux déjà cités où le diphénol agit favorablement sur la croissance, celui-ci intervient, éventuellement avec d'autres mécanismes, en augmentant de façon importante la quantité d'auxine dans les parties aériennes et en diminuant de ce fait la croissance du végétal par le biais d'une situation hyperauxinique.

CHAPITRE II

COMPOSES PHENOLIQUES ET TRANSPORT POLARISE DE L'AUXINE

A - INTRODUCTION : TRANSPORT DE L'AUXINE ET THEORIES SUR LA POLARITE

Dans les différents processus physiologiques qu'elle contrôle, l'auxine intervient généralement à distance de son lieu de synthèse. La migration de l'AIA assure donc une fonction de première importance dans le déterminisme de la croissance et du développement des végétaux : élongation (EVANS et HOKANSON, 1969 , De la FUENTE et LEOPOLD, 1970), tropisme (SHEN-MILLER et al., 1969 ; SHEN-MILLER 1973), division cellulaire et différenciation (TORREY et al., 1971 ; WODZICKI et WODZICKI, 1973), dominance apicale (PHILLIPS, 1975), sénescence et abscission (MORGAN et DURHAM, 1972). Selon LEOPOLD et KRIEDEMANN (1975) dans une mise au point sur ces problèmes, les plantes renferment des hormones qui manifestent des actions plus spectaculaires que l'AIA, mais aucune ne présente aussi nettement la faculté de transporter des messages d'un point à l'autre du végétal.

1.- Caractéristiques du transport de l'auxine

C'est WENT, en 1928, qui le premier mit en évidence un mouvement polarisé de l'auxine du sommet vers l'extrémité inférieure de coléoptiles d'Avoine. Cette propriété ,considérée dès les premiers travaux comme une des plus caractéristiques de l'auxine ,a été généralisée par la suite à des organes variés : tige, racines.

Des recherches effectuées pour caractériser ce mode de transport , on peut retenir un certain nombre de faits essentiels développés dans différentes revues (GOLDSMITH, 1968 ; GOLDSMITH, 1977).

. le transport de l'auxine dans les tissus ne correspond pas à une simple diffusion : la vitesse de circulation, de l'ordre de 10 à 12 mm/heure suivant les organes, est toujours plus grande que la vitesse de diffusion, qui, elle, est d'environ 2 mm/heure.

. il est important dans les parties apicales, fortement ralenti dans les cellules plus âgées.

. ce mouvement est lié à un métabolisme actif des tissus : des conditions défavorables -basses températures, mauvaises aérations des tissus (HERTEL et LEOPOLD, 1963)- des inhibiteurs de certains processus métaboliques -DNP, acide iodoacétique, acide p-chloromercuribenzoïque, dérivés chlorés de l'acide benzoïque (NIEDERGANG-KAMIEN et LEOPOLD, 1956 ; KEITT et BAKER, 1966)- ralentissent le transport polarisé.

. il est hautement spécifique des substances de type auxinique: comme l'AIA, les autres analogues auxinomimétiques (ANA, 2,4 D) sont véhiculés de manière polarisée (MORRIS et THOMAS, 1974).

. il présente un effet de saturation : quelles que soient les concentrations utilisées, les quantités d'auxine transportées sont identiques pour un même volume de tissu (HERTEL et LEOPOLD, 1963).

. il est assuré de cellule à cellule par l'intermédiaire du cytoplasme, et non par les systèmes de conduction de la plante (phloème, xylème) (LEOPOLD et De la FUENTE, 1968 ; GOLDSMITH et RAY, 1973 ; CANDE et RAY, 1976).

2.- Théories sur la polarité du transport auxinique

Pour expliquer le déplacement polarisé des auxines, différentes théories ont été proposées dont deux actuellement retiennent plus particulièrement l'attention (GOLDSMITH, 1977). Il s'agit :

. du concept classique de la secrétion polaire,

. de la théorie plus récente de la diffusion chimiosmotique.

Ces deux théories présentent un point commun concernant le mode "d'entrée" de l'auxine à la partie apicale des cellules (influx) qui s'effectuerait par simple diffusion à travers les membranes (CHRISTIE et LEOPOLD, 1965 ; GOLDSMITH et RAY, 1973 ; CANDE et RAY, 1976). Elles diffèrent par contre sur les modalités intervenant lors de la "sortie" de l'AIA à la partie basale (efflux).

- Secrétion polaire

L'auxine se déplacerait dans le cytoplasme et serait secrétée à la partie basale de chaque cellule par un transporteur de nature protéique, localisé dans les membranes. Le processus nécessiterait un apport continuel d'énergie (phénomène métaboliquement actif). Des inhibiteurs comme le TIBA (acide triiodobenzoïque) et l'ANP (acide naphtyl phtalamique) qui affectent l'efflux de l'AIA mais non sa pénétration dans la cellule (CANDE et RAY, 1976) interviendraient en se liant aux sites de transport (HERTEL et al., 1969, 1972), préférentiellement à l'auxine.

- Théorie de la "diffusion chimiosmotique"

Cette théorie, qui découle essentiellement des travaux de RUBERY et SHELDRAKE (1973, 1974) d'une part , de RAVEN (1975) d'autre part, s'appuie sur le phénomène d'ionisation de l'auxine au sein du cytoplasme (Figure 12).

La forme non ionisée de l'auxine (AIAH) est, en raison de son caractère lipophile, véhiculée dans la cellule à travers la membrane plasmique. Cette pénétration se poursuit tant que sa concentration (AIAH) n'est pas identique de part et d'autre du plasmalemme. Cependant, à l'intérieur du cytoplasme (pH = 7), l'auxine s'ionise de manière plus importante que dans la paroi (pH = 5,8), ce qui permet l'entrée continue de la forme non dissociée (l'équilibre de diffusion n'étant jamais pratiquement atteint) et entraîne la prépondérance de la forme AIA^- dans le compartiment cytoplasmique.

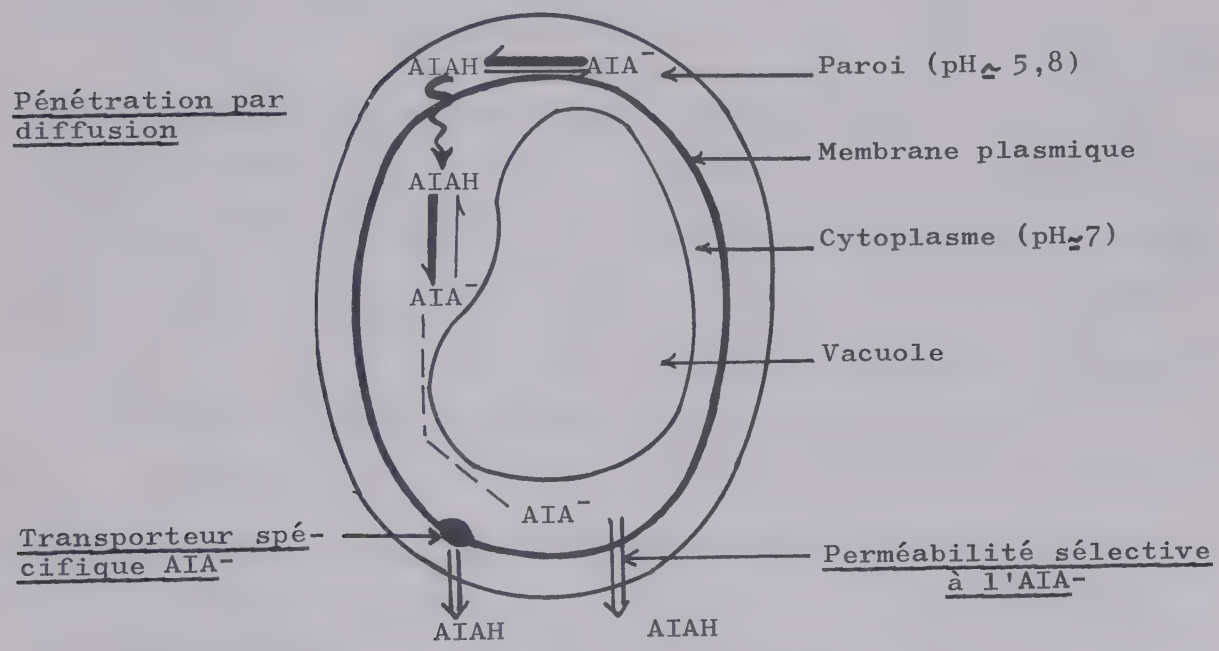


Figure 12 - Schéma récapitulatif du mode de translocation polarisé de l'auxine selon la théorie chimiosmotique.

Le mouvement polaire de l'hormone tirerait son origine :

- soit de la présence de transporteur spécifique de la forme AIA^- localisé à la base de la cellule (RUBERY et SHELDRAKE, 1974),

- soit d'un rapport des coefficients de perméabilité des deux formes respectives de l'auxine $\frac{P(AIA^-)}{P(AIAH)}$ plus élevé à la base qu'à la partie apicale des cellules (RAVEN, 1975).

Selon ces hypothèses, le transport polarisé de l'auxine implique la diffusion de l'AIA dans les cellules en réponse à un gradient de pH couplé soit à la présence de transporteurs, soit à une perméabilité préférentielle de la forme AIA^- à la partie basale (Figure 12). Le processus est actif car il implique une dépense d'énergie pour maintenir le gradient de pH (RUBERY et SHELDRAKE, 1974) par l'intermédiaire notamment d'une secrétion active de protons vers les compartiments extra cytoplasmiques (GOLDSMITH, 1977).

En résumé, cette étude bibliographique permet de relever un certain nombre d'éléments susceptibles de prendre plus ou moins directement une part active dans le transport polarisé de l'auxine :

- le contrôle du pH des différents compartiments cellulaires,
- la nécessité d'un apport continuel d'énergie,
- la fixation de l'AIA sur des transporteurs membranaires de nature protéique.

Les facteurs qui agissent sur ces différentes phases peuvent exercer un contrôle sur le mode de transport de l'auxine. Compte tenu de l'implication des composés phénoliques dans certains de ces processus (métabolisme énergétique, formation de complexes avec les protéines) j'ai tenté :

-d'analyser les répercussions d'une stimulation de la teneur en phénols sur le transport de l'auxine,

- de rechercher enfin quelles pouvaient être leur modalité d'action dans d'éventuelles modifications de la migration.

B - EFFET INHIBITEUR DES COMPOSES PHENOLIQUES SUR LE TRANSPORT POLARISE DE L'AUXINE CHEZ *Lycopersicum*

1.- Définition d'un protocole expérimental en vue d'apprécier le mouvement polarisé de l'auxine

Pour respecter le plus possible les conditions physiologiques, j'ai tenté d'étudier le transport de l'auxine sur des plants entiers. Des travaux antérieurs ont montré que, dans ces conditions, les caractéristiques du mouvement de l'auxine exogène dépendent essentiellement de l'organe qui les exporte (BONNEMAIN, 1971):

- appliquée sur les feuilles, l'hormone serait véhiculée très rapidement (sensiblement à une vitesse voisine de 20 mm/heure) avec

les éléments de la sève élaborée, par l'intermédiaire du phloème.

- à partir du bourgeon apical, sa migration s'effectuerait plus lentement (10 mm/heure), de manière polarisée (sens basipétale), suivant un mécanisme identique à celui mis en évidence pour des tiges et des coléoptiles sectionnés (MORRIS et al., 1973). Les cellules méristématiques situées entre le xylème et le phloème, certains éléments du phloème, ainsi que les cellules parenchymateuses du protoxylème représenteraient les lieux de transit de l'AIA (BONNEMAIN et BOURBOULOUX, 1973 ; WANGERMANN, 1974).

En fonction de ces données, j'ai cherché à définir un protocole qui me permette d'apprécier le mouvement polarisé de l'AIA chez Lycopersicum.

a - Techniques expérimentales

- Origine et caractéristiques des composés radioactifs utilisés

L'AIA ^{14}C (marqué sur le carbone 2 du noyau), 34,4 mCi/mmol et la leucine (G) ^{3}H, 208 mCi/mmol proviennent du C.E.A., l'acide 1-naphtyl acétique 1-^{14}C 61 mCi/mmol et le saccharose U^{14}C 10 mCi/mmol du Centre Radiochimique d'Amersham.

- Etude du transport de l'auxine

L'auxine en solution aqueuse est déposée avec une microseringue de Marburg (5 µl) soit au niveau du bourgeon apical intact, soit après avoir éliminé celui-ci sur la section ainsi réalisée. Après 14 heures de migration, on apprécie la translocation de l'auxine en mesurant la radioactivité globale décelée dans différentes régions en dessous du point d'application et plus particulièrement les racines. Dans certaines expériences, la distribution de l'auxine est analysée plus spécifiquement en déterminant, après purification, la radioactivité décelée dans la molécule d'AIA (MARIGO et BOUDET, 1977).

Chaque détermination est la valeur moyenne obtenue à partir de différentes expériences; l'écart type (ET) correspond à un seuil de probabilité de 95 %.

- Estimation de la radioactivité

On apprécie la radioactivité globale (^{3}H ou ^{14}C) après combustion des échantillons végétaux correspondants à l'"Oxydiser" Packard. La radioactivité présente sous forme d'AIA ^{14}C est déterminée, après isolement de ce composé par chromatographie sur papier, selon un protocole identique à celui décrit dans le chapitre I (page 81). La mesure de la radioactivité des isotopes s'effectue au spectromètre à scintillation Packard (modèle 22-11) après correction du quenching par la méthode du rapport des canaux.

b - Caractérisation du mode de transport assurant chez Lycopersicum esculentum la circulation de l'auxine

Déposée au niveau du bourgeon apical intact de plants de Tomate, l'auxine (AIA ou ANA) migre peu, probablement en raison d'une part de sa faible pénétration, d'autre part de la compétition qui s'établit vis à vis du "système de transport" entre l'auxine radioactive apportée et les mêmes molécules inertes synthétisées dans cette zone par le végétal. Par contre, après avoir éliminé le bourgeon apical qui représente un site de synthèse prépondérant, la fraction radioactive atteignant les racines se révèle plus importante : 21 °/oo de la quantité déposée pour les plants témoins après 14 h de migration. Par la suite, j'ai donc le plus souvent utilisé des plants à bourgeon apical excisé.

Pour caractériser le mode de transport de l'auxine appliquée de façon exogène sur ce matériel, j'ai retenu comme critère l'action du TIBA. Ce composé inhibe spécifiquement la migration polarisée de l'AIA (MORRIS et al., 1973) et son apport préalable devait ralentir ou supprimer la migration de l'auxine vers les racines. Le prétraitement des plants est effectué par trempage du système radiculaire dans une solution de TIBA 2×10^{-5} M pendant 3 h, selon la technique utilisée pour l'acide quinique.

TABLEAU XXV

Radioactivité globale (dpm) parvenue dans les racines après incorportation de ANA ^{14}C (5 µl d'une solution 7×10^{-4} M, 500 000 dpm) dans le cas de plants de Tomate traités ou non par le TIBA. L'apport de ANA ^{14}C est réalisé 6 heures après la fin du traitement TIBA. Ces résultats représentent la moyenne (plus ou moins l'écart type) obtenue à partir de 4 répétitions

Plants témoins	Plants traités par le TIBA
23 197 ± 2 176	3 205 ± 599

Les résultats présentés dans le tableau XXV montrent qu'après action du TIBA, seule une fraction peu importante de l'ANA ^{14}C incorporé (14 % de la radioactivité décelée dans les témoins) parvient dans le système radiculaire, probablement à partir des feuilles, par l'intermédiaire du phloème (MORRIS et al., 1973). Le complément, soit près de 86 % de l'isotope radioactif fourni, est transporté de manière polarisée dans ces organes. Chez la Tomate, l'auxine exogène appliquée au niveau de l'apex migre essentiellement vers les racines suivant un mouvement polarisé. J'ai donc retenu ce protocole dans la suite de mon expérimentation.

2.- Effet d'un traitement par l'acide quinique sur la translocation de l'AIA

A la suite du traitement qui stimule la teneur en composés phénoliques du végétal, on constate, lorsque l'AIA ^{14}C est déposé soit au niveau du bourgeon apical intact, soit sur une section réalisée après avoir éliminé celui-ci, une diminution de la fraction radioactive atteignant les racines (Tableau XXVI).

TABLEAU XXVI

Radioactivité (°/oo de la radioactivité fournie) atteignant les racines de plants témoins et traités (5 jours) par l'acide quinique après incorporation de 5 µl d'une solution 5 x 10^{-4}M d'AIA ^{14}C (34,4 mCi/mmol). Une répétition de cette expérience a conduit à des résultats sensiblement identiques

Mode d'incorporation de l'AIA^{14}C	Radioactivité détectée dans les racines	
	Témoin	Essai
Bourgeon apical intact	0,42	0,14
Section réalisée à la base du bourgeon apical	21	7,2

L'auxine semble donc subir un retard dans sa translocation lorsque la teneur en phénols du végétal est stimulée. Cependant, dans le cas des individus traités, différents paramètres peuvent interférer dans cette évaluation globale. J'ai donc entrepris un certain nombre de vérifications.

- Etude de la circulation de l'auxine en fonction de la durée du traitement

Consécutivement à l'augmentation des teneurs en composés phénoliques, les plants correspondants subissent un ralentissement de croissance qui affecte non seulement l'allongement du système aérien mais également le diamètre des tiges. Je n'ai pas tenté de faire intervenir un facteur correctif tenant compte de ces deux paramètres géométriques qui doivent avoir une influence inverse sur la proportion de radioactivité atteignant les racines. Par contre, j'ai comparé l'incidence d'une augmentation en phénols sur la migration de l'auxine ainsi que d'une molécule véhiculée de manière différente et servant ici de référence, la leucine (MORRIS et THOMAS, 1974). Les résultats de la figure 13 montrent que, quel que soit le nombre de jours de traitement par l'acide quinique (donc l'importance de la stimulation phénolique

et du ralentissement de croissance), la radioactivité globale parvenue dans les racines après apport de leucine ^{3}H apparaît peu différente de celle décelée dans le système radiculaire de plants témoins. L'effet éventuel d'une réduction du diamètre des organes conducteurs sur les processus de transport semble compensé par la diminution du trajet à parcourir. Par contre, après incorporation d'AIA ^{14}C, l'isotope radioactif subit un retard très significatif dans sa translocation dès le troisième jour de traitement. A ce stade, les modifications de taille ne se sont pas encore manifestées mais on ne détecte plus dans les racines des individus traités que 70 % de la radioactivité mesurée dans le cas des témoins. Pour des traitements par l'acide quinique de plus longue durée, le ralentissement de la migration de l'AIA est encore plus net (réduction de l'ordre de 60 %).

Les variations observées dans la circulation de l'auxine paraissent donc attribuables à certains effets du traitement par l'acide quinique, mais non à la diminution de taille qui en résulte.

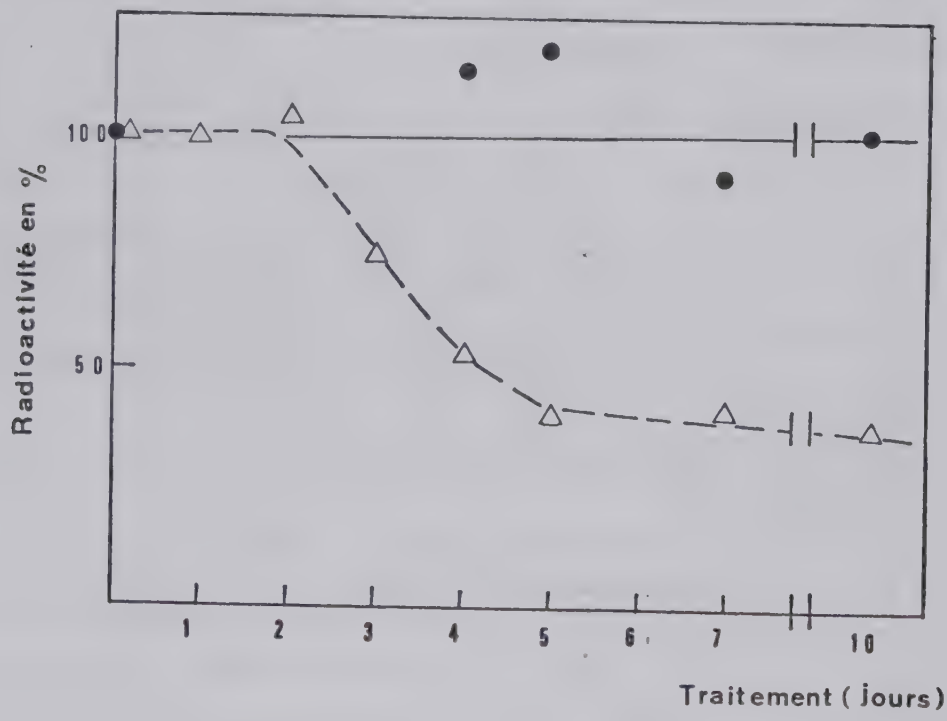


Figure 13 - Migration comparée de l'AIA ^{14}C (△----△) et de la leucine ^{3}H (●——●) sur des plants "quinate" en fonction du nombre de jours de traitement. Les deux composés radioactifs sont apportés en mélange, soit 5 µl d'une solution d'AIA ^{14}C, 5×10^{-4} M (34,4 mCi/mmol) et de leucine ^{3}H, 2×10^{-4} M (208 mCi/mmol). Les résultats sont exprimés séparément, radioactivité ^{14}C - radioactivité ^{3}H, en % des valeurs décelées dans les racines d'individus du même âge non traités par l'acide quinique. Pour cette expérience, le temps de migration est de 6 heures.

- Rôle éventuel des phénomènes d'inactivation ou de dégradation de l'AIA dans les modifications observées au niveau du transport

A partir du bourgeon apical, l'auxine est véhiculée vers les différents organes de la plante, et si elle ne s'y accumule pas, c'est qu'elle subit en même temps un certain nombre de transformations: inactivation par liaison avec d'autres molécules, dégradation par le biais de l'AIA oxydase conduisant à différents produits qui ne présentent pas les caractéristiques de migration de l'AIA. Pour tenir compte en partie de ces éléments, KALDEWEY distingue la fraction auxine "transportable" de la fraction "immobilisée". Ainsi, après application d'AIA ^{14}C à des plants intacts de Gossypium hirsutum (KALDEWEY et KRAUS, 1972), la majeure partie du ^{14}C se retrouve "immobilisée" essentiellement sous forme d'indole 3 acétyl-glucose ; seule une fraction infime se révèle "transportable".

J'ai donc estimé, à différents niveaux de la plante, la fraction "AIA ^{14}C libre" par rapport aux autres formes présentes (Tableau XXVII) dans les témoins et les essais.

TABLEAU XXVII

Radioactivité globale et radioactivité de la molécule d'AIA ^{14}C (en dpm) décelées à différents niveaux de plants témoins (T) et traités (E) par l'acide quinique (6 jours de traitement). Radioactivité fournie: 15×10^5 dpm (5 µl d'une solution 4×10^{-3} M). Hauteur des parties aériennes : T = 7,8 cm ; E = 6,5 cm. Ces résultats représentent les valeurs moyennes de deux déterminations (± ET)

Partie des plants	Radioactivité globale		Radioactivité de l'AIA ^{14}C		$\frac{\text{Rad.AIA } ^{14}C}{\text{Rad. globale}} \times 100$	
	T	E	T	E	T	E
Feuilles Entrenoeud	1 134 000 ± 73 192	1 421 699 ± 38 000	90 198 ±10 200	196 000 ±13 200	7,9 %	13,7 %
Hypocotyle	103 621 ±17 000	66 195 ±6 200	4 835 ± 935	6 144 ±1 300	4,6 %	9,2 %
Racines	40 000 ±2 000	18 200 ± 650	4 440 ± 630	2 535 ± 800	11,1 %	13,9 %

Chez Lycopersicum comme pour d'autres espèces (MORRIS et al., 1969 ; KALDEWEY et KRAUS, 1972), le pourcentage de ^{14}C parvenu dans le système radiculaire sous forme d'AIA après 14 heures de migration est très faible (0,29 % du carbone radioactif apporté pour les plants témoins, soit sensiblement 11 % de la radioactivité globale atteignant ces organes). La même observation peut être réalisée au niveau des hypocotyles et dans la région feuilles - entrenoeud puisque,par rapport à la radioactivité totale déterminée dans ces deux zones, on ne relève plus respectivement que 4,6 % et 7,9 % d'AIA ^{14}C libre. Parallèlement à la conduction, intervient donc de manière importante un phénomène de transformation de l'auxine. Cependant, comparativement aux témoins (T), ce facteur apparaît moins accentué pour les plants dont la teneur en phénols est stimulée (E). En se référant à la radioactivité globale localisée dans les différentes zones, on constate que le pourcentage d'AIA ^{14}C libre est toujours plus élevé dans le cas des individus traités. Conformément aux résultats obtenus dans le chapitre précédent, il est probable qu'en stimulant la teneur en phénols, on provoque également,chez Lycopersicum , un ralentissement de la destruction oxydative de l'auxine.

Dans le cas des plants traités, il se confirme donc bien que les processus de transformation ne peuvent expliquer les différences constatées dans la circulation de l'AIA.

- Effets spécifiques du traitement sur la circulation polarisée de l'auxine

J'ai étudié, sur des plants entiers, l'influence du traitement sur la conduction :

- de l'acide naphtalène acétique, qui ,comme l'auxine,emprunte le même système de transport (MORRIS et THOMAS, 1974),
- du saccharose et de la leucine, substances se déplaçant de manière apolaire avec les éléments de la sève élaborée (MORRIS et THOMAS, 1974).

En ce qui concerne l'ANA (Tableau XXVIII), l'apport d'acide quinique détermine un retard dans la translocation du même ordre de grandeur que celui affectant le déplacement de l'AIA. Dans ce cas, la radioactivité globale qui parvient dans les racines est plus importante ; l'hormone peut être inactivée (MORRIS et THOMAS, 1974) mais n'est pas dégradée par le système oxydasique. En revanche, la leucine et le saccharose ne voient pas leur conduction modifiée de manière significative (Tableau XXVIII).Cet ensemble d'observations , associé aux résultats précédemment présentés (Figure 13),plaide donc

en faveur d'une intervention spécifique du traitement sur le transport polarisé de l'auxine

TABLEAU XXVIII

Radioactivité globale (dpm) parvenue dans les racines de plants témoins (T) ou traités (E) 5 jours par l'acide quinique après apport de 5 µl d'une solution contenant les précurseurs radioactifs : AIA ^{14}C ($1,2 \times 10^{-3}$ M) et ANA ^{14}C (7×10^{-4} M) 500 000 dpm ; Leucine ^{3}H (10^{-4} M) et saccharose ^{14}C (2×10^{-3} M) 450 000 dpm. Chaque valeur représente la moyenne de 4 répétitions (± ES)

Traitement	AIA ^{14}C	ANA ^{14}C	Leucine ^{3}H	Saccharose ^{14}C
Témoins	15 135 ± 714	21 325 ±1 182	5 141 ± 479	8 382 ± 750
Essais traités	7 360 ± 593	13 032 ± 768	6 181 ± 549	10 153 ± 634

3.- Démonstration du rôle des composés phénoliques dans le transport polarisé de l'auxine

- Influence d'un apport en composés phénoliques sur la circulation de l'auxine

Afin de confirmer l'intervention des composés phénoliques, j'ai déposé, sur des sections réalisées à la base du bourgeon apical, l'auxine radioactive seule ou en présence d'extraits végétaux obtenus à partir de plants de Tomate traités par l'acide quinique et contenant ou non des polyphénols. Le mode d'obtention des extraits est décrit dans le chapitre précédent (page 82).

Les résultats présentés dans le tableau XXIX (page 106) montrent qu'après application de l'extrait contenant des polyphénols (E_1) on détecte deux fois moins d'AIA dans les racines, alors que la même solution débarrassée de ces composés par passage sur Polyclar (E_2) ne provoque aucune modification dans le transfert du traceur. Comme dans le cas des expériences in vivo, l'ANA subit également au cours de son déplacement un retard identique à celui de l'AIA, alors que le mouvement de la leucine tritiée n'est pas affecté par l'apport en phénols.

TABLEAU XXIX

Radioactivité globale décelée dans les racines après apport d'auxine ^{14}C (AIA ou ANA) et de leucine ^{3}H en mélange, au niveau du bourgeon apical sectionné. Les molécules radioactives sont déposées seules (T non traité), en mélange (E_1) avec un extrait végétal contenant des polyphénols (9,2 µg équivalents en acide chlorogénique), ou avec le même extrait débarrassé des phénols par passage sur Polyclar (E_2). Radioactivité fournie : AIA ^{14}C (5×10^{-4} M), 288 000 dpm ; ANA ^{14}C (7×10^{-4} M), 500 000 dpm ; leucine ^{3}H (10^{-4} M) 450 000 dpm. Les différentes valeurs ont été obtenues en faisant la moyenne de 4 déterminations (±ET)

	T (non traité)		E_1 (extrait phénolique)		E_2 (extrait débarrassé des phénols)	
Migration	Auxine ^{14}C	Leucine ^{3}H	Auxine ^{14}C	Leucine ^{3}H	Auxine ^{14}C	Leucine ^{3}H
AIA	4 106 ± 232	1 165 ± 120	1 937 ± 133	967 ±129	4 086 ± 110	890 ±98
ANA	22 054 ±1 947	- -	13 002 ± 932	- -	23 728 ±1 722	- -

Ces différents arguments militent donc en faveur d'une intervention des composés phénoliques sur le transport polarisé de l'auxine.

- Généralisation de l'effet des polyphénols sur le transport de l'auxine

Afin d'apprécier le degré de généralité de l'intervention des phénols dans la translocation de l'auxine, j'ai comparé, par les méthodes déjà utilisées, le transport de l'ANA ^{14}C pour des plants soumis à certains traitements entraînant une stimulation du pool phénolique.

Les résultats obtenus montrent, dans le cas d'une carence en bore comme après infection par Fusarium oxysporum, que l'auxine subit un ralentissement dans sa translocation (respectivement de 50 et 69%). Dans des situations aussi complexes, la difficulté d'établir de manière certaine des relations de cause à effet entre le stimulus initial et une réponse particulière du végétal a déjà été évoquée (page 70). Cependant, les résultats acquis vont dans le sens des données précédentes et permettent d'attribuer aux composés phénoliques naturels un rôle dans le contrôle de la circulation polarisée de l'auxine.

4.- Conclusion

Les résultats présentés dans ce travail apportent différents arguments en faveur d'une intervention des composés phénoliques dans le transport polarisé de l'auxine. Aussi bien en utilisant des plants dont la teneur en phénols est stimulée in vivo qu'après apport exogène de ces composés au végétal; on constate un ralentissement de la

translocation de l'auxine. Ces différences ne doivent pas être attribuées à une diminution de la fraction "auxine libre" dans le cas des plants traités. En effet, si durant sa migration l'AIA subit des phénomènes de transformation, ceux-ci apparaissent moins accentués pour les plants dont la teneur en phénols est stimulée, ce qui est conforme à l'idée d'une intervention de certains polyphénols en tant que protecteurs d'auxine (DOUMENJOU et MARIGO, 1978). De plus, l'effet des phénols sur le transport concerne uniquement les substances de nature auxinique(AIA, ANA), et d'autres composés comme la leucine ou le saccharose ne voient pas leur migration affectée.

Le ralentissement de la migration de l'AIA doit être en partie à l'origine de l'élévation des teneurs en hormone constatée dans les parties aériennes, l'auxine atteignant moins rapidement ses sites de dégradation (vraisemblablement racinaires). Dans la poursuite du travail, je me suis attaché à préciser la nature des phénols susceptibles d'intervenir ainsi que leurs modalités d'action.

C - NATURE DES PHENOLS IMPLIQUES DANS LES MODIFICATIONS DU TRANSPORT DE L'AIA et ETUDE DE LEUR MODE D'ACTION

En fonction des données que l'on possède sur la circulation polarisée de l'auxine,cette étude a été entreprise en recherchant successivement :

- d'éventuelles compétitions au niveau de sites récepteurs de l'auxine,
- des modifications du pH cellulaire consécutives au traitement.

1.- Recherche de la nature des composés phénoliques intervenant dans le ralentissement du transport de l'AIA

Le traitement par l'acide quinique entraîne une augmentation de termes phénoliques solubles du type acide chlorogénique, mais aussi l'apparition de produits d'oxydation comme cela a été évoqué dans le chapitre précédent. J'ai tenté d'apprécier l'importance relative de ces deux catégories de composés dans la migration polarisée de l'auxine.

Chez la Tomate, le fractionnement des composés phénoliques par extractions sélectives(Chapitre I, page 82) permet de différencier

- des substances extractibles par le méthanol et correspondant pour la plupart à des depsides de l'acide quinique,
- des substances solubles en milieu aqueux, parmi lesquelles on peut caractériser des produits de transformation de l'acide chlorogénique (DOUMENJOU et MARIGO, 1978).

Sur la base de ce fractionnement global, j'ai comparé, sur le transport de l'ANA, l'effet de ces deux types d'extraits obtenus à partir de plants traités par l'acide quinique 4×10^{-2} M (Tableau XXX).

TABLEAU XXX

Effet des composés phénoliques extractibles par le méthanol ou en milieu tamponné sur le transport de l'ANA ^{14}C. La molécule radioactive (5 µl d'une solution 7×10^{-4} M, 500 000 dpm) est déposée seule (T), en mélange avec les extraits (E) ou après apport préalables de ces derniers. On apprécie la radioactivité globale (dpm) parvenue dans les racines après 14 h de migration. Chaque valeur est la moyenne de 5 déterminations

Caractéristiques de l'expérience	T	E global	E méthanol	E "aqueux"
Extraits déposés en mélange avec l'ANA ^{14}C	20 757 ±1 240	11 598 ± 410	22 674 ±1 280	11 692 ± 720
Extraits déposés 3 h avant l'ANA ^{14}C	21 940 ±1 550	11 930 ±1 035	14 990 ±1 480	11 025 ±1 200

Lorsque l'auxine est apportée au niveau du bourgeon apical sectionné en mélange avec les différents extraits, seul celui préparé en utilisant un solvant aqueux affecte la translocation de l'ANA. Par contre, si les extraits sont déposés 3 h avant l'application de l'auxine radioactive, chacun d'eux provoque un ralentissement de la migration du traceur dans les racines. L'effet sur le transport polarisé paraît donc spécifique de certains produits extraits du végétal en milieu aqueux tamponné mais susceptibles de se former, in situ, à partir de composés de type chlorogénique. De fortes présomptions tendaient à attribuer ce rôle à des formes oxydées.

Pour vérifier ce point, j'ai apprécié la translocation de l'ANA après avoir déposé, au préalable, les polyphénols extractibles par le méthanol, seuls ou en présence d'un agent antioxydant, le glutathion (GSH). Dans ces conditions (Tableau XXXI), il s'avère que l'action du glutathion s'oppose au ralentissement de la translocation de l'auxine provoqué par l'apport initial de l'extrait méthanolique.

Durant le laps de temps (3 h) qui précède l'application de l'ANA ^{14}C, le glutathion intervient en empêchant certaines transformations s'opérant au niveau du bourgeon apical sectionné.

TABLEAU XXXI

Effet sur le transport polarisé de l'ANA ^{14}C (5 µl d'une solution 7 x 10^{-4} M, 500 000 dpm) d'un extrait "méthanolique" contenant des polyphénols seuls (E_1) ou en présence (E_2) de glutathion (5 µg pour 5 µl). L'auxine est déposée seule (T), 3 h après l'addition de glutathion (T_{GSH}) ou des extraits E_1 et E_2 correspondants. Moyenne de 4 déterminations

	T	T_{GSH}	E_1 méthanol	E_2 méthanol + GSH
Radioactivité dans les racines (14 h de migration)	17 374 ±2 000	16 612 ±1 500	7 963 ± 200	12 089 ± 210

Une des réactions commune aux végétaux soumis à certains stress consiste, notamment dans le cas de lésions mécaniques, en une augmentation de l'activité peroxydase, enzyme d'oxydation des polyphénols (PRIDHAM, 1960). Ce biocatalyseur pouvait donc représenter le chaînon indispensable à la réalisation de la séquence des événements précédents. Dans cette optique, j'ai fait agir la peroxydase commerciale sur des extraits phénoliques de plants de Tomate, avant d'apprécier leur action sur le transport de l'ANA (Tableau XXXII).

TABLEAU XXXII

Action des produits de transformation des polyphénols par la peroxydase commerciale sur le transport de l'ANA ^{14}C. L'extrait "méthanolique" est mis à incuber en présence de peroxydase et d'H_2O_2. Après 2 h de réaction à température ambiante, on évapore à sec et on reprend avec H_2O par le volume de départ. L'auxine (5 µl d'une solution 7 x 10^{-4} M, 500 000 dpm) est déposée seule (T) ou en mélange avec les différents milieux d'incubation. Moyenne de 4 déterminations

	T	Extrait "méthanolique"	Extrait "méthanolique" après action de la peroxydase	Peroxydase et H_2O_2
Radioactivité dans les racines après 14 h de migration	23 297 ±2 200	24 278 ±2 320	14 249 ±2 000	23 971 ±1 600

Seul l'extrait préalablement traité par la peroxydase et en présence d'H_2O_2 affecte la migration du traceur. L'action sur le transport paraît donc spécifique des produits d'oxydation des polyphénols.

Je n'ai pas cherché à identifier, parmi ces formes oxydées, la nature du ou des composés plus particulièrement concernés ; ces produits, en raison de leur toxicité sont très peu représentés chez les végétaux et de ce fait actuellement mal connus. Par contre, j'ai tenté de définir leur modalité d'action ; une possibilité pouvait consister en une fixation, à la place de l'auxine, sur les protéines impliquées dans le transport de l'hormone. J'ai donc recherché tout d'abord la présence de protéines réceptrices de l'AIA chez Lycopersicum.

2.- Recherche de "récepteurs" de l'auxine chez Lycopersicum

De nombreux auteurs ont suggéré l'existence de protéines réceptrices de l'AIA pour rendre compte, au niveau moléculaire, du mode d'action de l'auxine aussi bien dans la multiplication cellulaire (HARDIN et al., 1972) que dans la phase d'élongation (Van der WOUDE et al., 1972). Des récepteurs seraient également impliqués dans le transport polarisé de cette hormone (HERTEL et FLORY, 1968).

Les arguments en faveur de ces hypothèses découlent d'observations démontrant l'aptitude de l'auxine à se fixer sur des protéines in vitro. Ainsi HERTEL et al. (1972) établissent l'existence d'interactions entre l'auxine et des fractions membranaires isolées de coléoptiles de Maïs. D'après les auteurs, ce type de fixation, réversible et non covalent, peut être considéré comme physiologique car il est spécifique des auxines ; des analogues auxinomimétiques (ANA, 2,4-D) ou des composés à propriétés auxiniques (TIBA) peuvent entrer en compétition avec l'AIA lors de cette fixation ; de plus, la constante de dissociation du complexe auxine - récepteur est du même ordre de grandeur que le Km apparent calculé à partir des cinétiques de saturation du transport et de la croissance. A partir de cet ensemble de faits, HERTEL postule que l'association récepteur membranaire - AIA serait à l'origine des réponses biologiques de l'auxine, notamment en participant activement au transport polarisé de l'hormone.

D'après les données récentes que l'on possède sur le mode de fixation de l'auxine, les récepteurs impliqués pourraient être de deux sortes :

- soit des protéines membranaires : le réticulum endoplasmique (ANA et AIA) , la membrane plasmique (2,4-D, ANP, morphactine) représenteraient les lieux de fixation de l'auxine ou d'autres composés à propriétés auxiniques ou antiauxiniques (NORMAN et al., 1975 ; HERTEL et al., 1976 ; RAY et DOHRMAN, 1977);

- soit des protéines solubles du "cytosol" (OOSTROM et al., 1975; ROY et BISWAS, 1977).

Ne disposant d'aucun élément sur l'existence de récepteurs chez Lycopersicum, j'ai cherché à caractériser systématiquement une fixation éventuelle de l'auxine sur les deux fractions précitées en utilisant la méthodologie couramment mise en oeuvre actuellement. Différentes techniques existent en effet pour quantifier in vitro la fixation de l'auxine : isolement de membranes après incubation avec le ligand radioactif (HERTEL et al., 1972), élimination de l'auxine radioactive non fixée par adsorption sur charbon activé (IHL, 1976), ou purification du complexe protéine - AIA par passage sur colonne de Sephadex équilibrée avec l'auxine radioactive (DOHRMANN et RAY, 1976). Les principes et les conditions d'application de ces techniques sont rappelés en annexe.

Quel que soit le protocole retenu, on cherche à distinguer le phénomène de fixation spécifique de l'AIA de phénomènes parasites de fixation aspécifique en tenant compte des critères suivants :

- l'interaction entre l'auxine et son récepteur spécifique est réversible et concerne un nombre limité de sites ; les molécules sont échangeables et il s'agit d'un phénomène saturable;

- à l'inverse, dans la fixation aspécifique, les faits expérimentaux semblent montrer que les interactions sont de nature différente : la liaison n'est pas saturable et n'apparaît pas échangeable.

La présence de récepteurs membranaires ayant été rapportée dans le cas d'organes en croissance active (HERTEL et al., 1972), les déterminations ont été effectuées sur des tiges de plants de 10 jours.

En aucun cas les résultats obtenus n'ont permis de caractériser, avec certitude, des récepteurs spécifiques de l'auxine chez la Tomate. On ne peut toutefois exclure la participation de protéines dans le transport polarisé de l'AIA, d'autant qu'en cours de rédaction de ce mémoire, MUDGE et POOVAIAH (1978) ont mis en évidence la présence de récepteurs membranaires de l'AIA dans ce même matériel. Cependant, il faut reconnaître que les techniques d'approche utilisées actuellement ne permettent d'apprécier que difficilement une fixation spécifique de l'AIA de faible amplitude, notamment pour des situations où la fixation aspécifique est importante.

Dans l'impossibilité de poursuivre cette voie de recherche, j'ai par la suite considéré le transport polarisé sous l'angle d'une régulation par le pH cellulaire, comme le prévoit la théorie chimiosmotique (GOLDSMITH, 1977).

3.- Mise en évidence de modifications du pH cellulaire ; répercussions sur le transport de l'auxine

Le transport polarisé de l'auxine apparaît comme le résultat d'une somme d'éléments faisant intervenir en particulier la notion d'ionisation de la molécule, en relation avec la valeur des pH intracellulaires. En effet, deux processus fondamentaux interagissent pour assurer la conduction de l'auxine des cellules productrices vers les organes cibles :

- un phénomène de diffusion de cellule à cellule, sans orientation précise, sous la seule dépendance de la valeur du pH cellulaire des différents compartiments, la membrane plasmique étant plus perméable à la forme non dissociée de l'auxine;
- un mécanisme qui interviendrait pour régler le sens de la polarité ; actuellement mal connu, il pourrait concerner cependant la forme ionisée de l'auxine (RUBERY et SHELDRAKE, 1974 ; RAVEN, 1975).

Des modifications du pH d'un ou des différents compartiments cellulaires pouvaient dérégler la coordination de chacun des événements précédents.

J'ai donc tenté de vérifier cette hypothèse en appréciant les effets du traitement sur la diffusion d'une substance synthétique de nature faiblement acide, le diméthyl-5-5 oxazolidine 2-4 dione, 2-^{14}C (DMO ^{14}C). Ce composé est utilisé pour apprécier les valeurs de pH cellulaire en raison de certaines de ses propriétés (WALKER et SMITH, 1975) :

- il ne se lie pas à des composés intracellulaires de type récepteur protéique comme dans le cas de l'auxine, et ne paraît donc pas devoir emprunter dans les tissus un trajet préférentiel,
- sauf de rares exceptions (LEGUAY, 1977) il n'est pas métabolisé.

Sa diffusion dans la cellule est sous la seule dépendance du pH, car les membranes sont uniquement perméables à la forme non dissociée de la molécule.

a - Techniques expérimentales

• Préparation de segments d'organes et incubation avec les traceurs radioactifs

L'étude de la pénétration des molécules radioactives a porté sur des segments d'hypocotyle. Ces derniers sont découpés , à l'aide de deux lames de rasoir à écartement calibré, en segments de 3 mm; certains d'entre eux sont conservés pour déterminer le poids de maté-

riel frais, une centaine d'autres introduits dans des béchers de 50ml contenant IO ml de tampon phosphate de potassium 0,1 M , pH 6,7 . Après addition du marqueur radioactif (0,45 µCi), les béchers sont placés sur un plateau oscillant (IOO oscillations /minute) sous un éclairement de 5 000 lux et une température de 25° C; dix segments sont ensuite prélevés à des temps variables , rincés sur verre fritté G 4 par le tampon du milieu d'incubation et leur radioactivité mesurée après combustion à l'Oxydiser Packard.

Lorsque l'on apprécie l'efflux, les fragments sont d'abord mis en présence des produits radioactifs dans les conditions précédentes pendant 3 heures; passé ce délai , le matériel végétal est prélevé, rincé à plusieurs reprises et un nombre de segments équivalents à 2 g de matériel frais , réintroduits dans le milieu d'incubation (10 ml) sans DMO ni ANA . Le prélèvement à des temps différents d'une fraction de 200 µl du milieu permet d'estimer la quantité de traceur "relarguée".

Afin d'éviter dans la mesure du possible des variations des teneurs en eau qui pourraient modifier le volume accessible au DMO,les expériences ont porté sur des segments d'hypocotyles traités par l'acide quinique pendant seulement cinq jours : à ce stade , les teneurs en eau entre plants témoins et essais sont peu différentes.De plus , la pénétration du DMO est appréciée par la mesure des concentrations intracellulaires (Ci) :

$$Ci = \frac{\text{Quantité de DMO absorbé}}{Vi}$$

le volume intracellulaire (Vi) correspondant à la teneur en eau des segments.

Le diméthyl-5-5 oxazolidine 2-4 dione, 2-^{14}C 54,2 mCi/mmol provient du C.E.A, l'acide 1-naphtyl acétique 1-^{14}C 61 mCi/mmol du Centre Radiochimique d'Amersham.

b - Résultats expérimentaux

. Etude de la pénétration et de l'efflux du DMO sur des segments d'organes

L'étude de la pénétration du DMO montre que ce composé est moins vite absorbé dans les segments d'hypocotyles de plants dont la teneur en phénols est stimulée (Figure 14 A) . Lorsque après sensiblement deux heures d'incubation l'équilibre de diffusion est atteint,les concentrations internes en DMO dans les hypocotyles témoins ou traités sont respectivement de 0,31 x IO^{-6} M et 0,26 x 10^{-6} M.

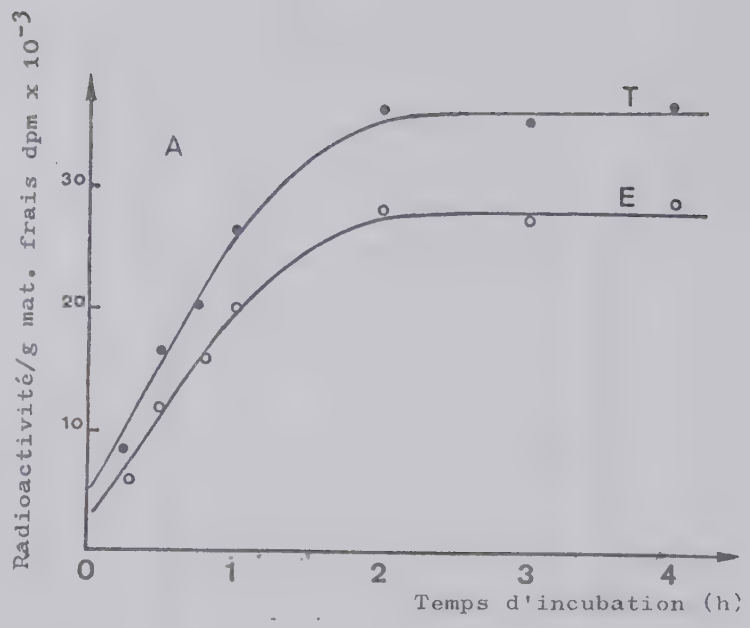


Figure14 A- Cinétique de la pénétration du DMO ^{14}C dans des segments d'hypocotyles de plants témoins (T) ou traités 5 jours par l'acide quinique 4 x 10^{-2} M (E). Les résultats sont exprimés en dpm par g de matériel frais. Dans le milieu d'incubation le DMO est à la concentration 0,8.10^{-6} M. Radioactivité fournie:0,44µCi dans 10 ml de milieu.

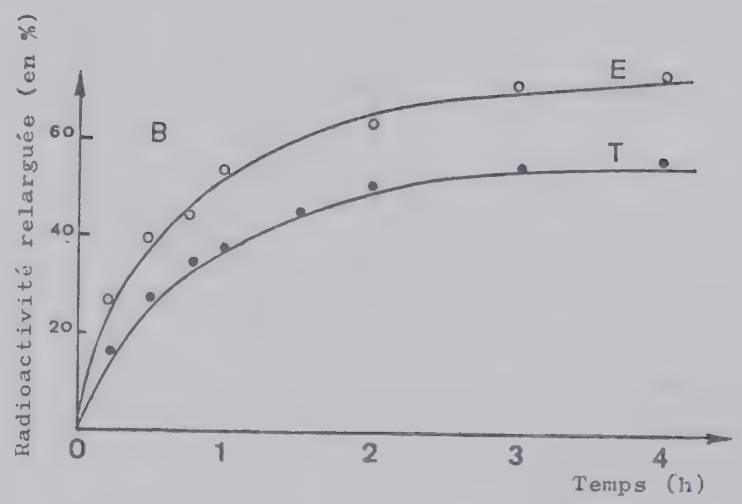


Figure14 B- Mesure de l'efflux du DMO ^{14}C en fonction du temps à partir de segments d'hypocotyles témoins (T) ou traités 5 jours par l'acide quinique 4x10^{-2} M (E). Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité globale présente dans les échantillons au temps de départ.

Cette modification de l'absorption ne résulte pas d'un mode de métabolisation différent du DMO pour les plants témoins et traités: d'une part , dans les 2 cas , un équilibre de diffusion s'établit après deux heures d'incubation ce qui prouve que le DMO n'est pas métabolisé(LEGUAY , 1977) ; d'autre part, après absorption du marqueur dans les segments et extraction des substances solubles, on relève la présence de cette seule molécule radioactive après autoradiographie d'un extrait global .

Il paraît plutôt vraisemblable , dès lors, d'attribuer ces variations d'absorption à une ionisation intracellulaire moins importante du DMO dans les plants traités.

Dans le cas de cellules végétales en culture, la détermination des concentrations intracellulaires en DMO permet d'apprécier une valeur globale du pH intracellulaire (WADDEL et BUTTLER ,I957 ; LEGUAY,I977). En présence d'un matériel aussi hétérogéne que des segments d'hypocotyles de par la diversité des assises cellulaires concernées, il n'est pas possible de déterminer une valeur précise du pH cellulaire . Cependant, si on considère seulement le sens des variations observées dans la diffusion du DMO, il semble que la stimulation des teneurs en composés phénoliques entraîne une diminution du pH intracellulaire.

Cette variation de pH se répercute sur l'efflux (Figure 14 B), le DMO étant "relargué" de manière plus importante par les individus traités.

. Etude du comportement de l'ANA selon ce type d'approche

En ce qui concerne l'ANA, on obtient des résultats inverses de ceux enregistrés avec le DMO (Figure 15 A et B, page 116) : pénétration plus importante dans les segments d'hypocotyles traités, "relarguage" moins intense dans le milieu d'incubation. Dans le cas de la pénétration, cette observation montre que le mouvement de l'auxine à travers les cellules n'obéit pas seulement à un phénomène de simple diffusion comme le DMO.

Quelle signification attribuer alors au sens de ces variations ? Si l'on apprécie les caractéristiques de pénétration de l'ANA en présence d'un inhibiteur du transport polarisé, le TIBA (Figure 16 , page 117), on constate, comme dans le cas des segments d'organes dont la teneur en phénols est stimulée (E par rapport à T), que celui-ci favorise l'absorption de l'ANA ^{14}C chez la Tomate (T_{TIBA} par rapport à T). Selon RUBERY et SHELDRAKE (1974) qui relèvent le même résultat pour des cellules de crown gall ou pour des segments de tiges de Pois,

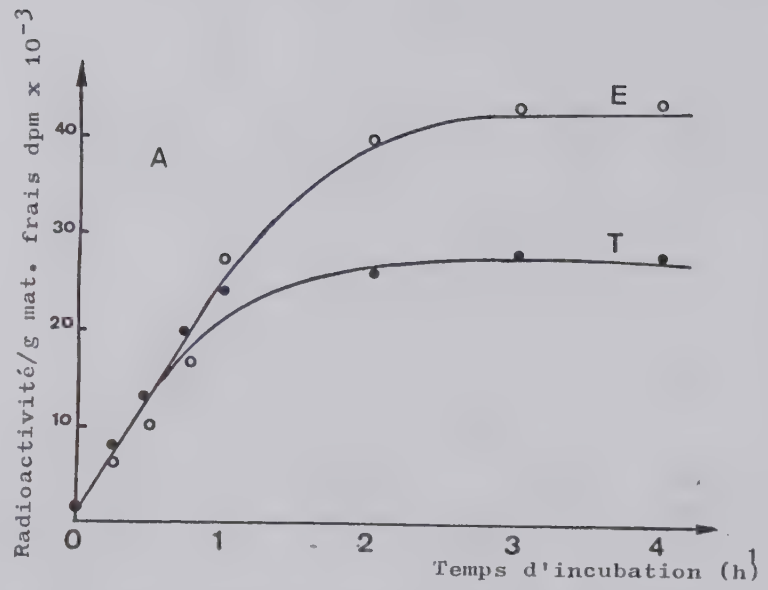


Figure15A - Cinétique de la pénétration du ANA ^{14}C dans des segments d'hypocotyles témoins (T) ou traités 5 jours par l'acide quinique 4×10^{-2} M (E). Concentration du ANA ^{14}C dans le milieu d'incubation $0,75.10^{-6}$M ; radioactivité fournie : 0,41µCi dans 10 ml de milieu.

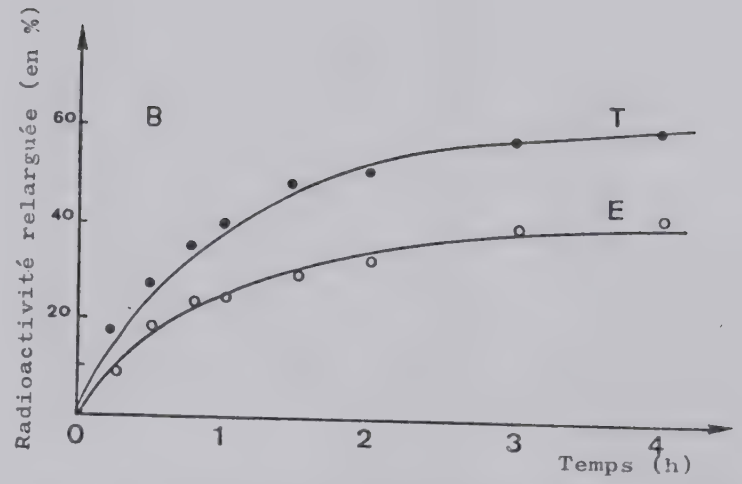


Figure15B - Etude de l'efflux du ANA ^{14}C à partir de segments d'hypocotyles témoins (T) ou traités 5 jours par l'acide quinique 4×10^{-2} M (E). Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité globale présente dans les échantillons au temps de départ.

le TIBA ralentirait spécifiquement l'efflux et par conséquent augmenterait la pénétration apparente du traceur.

Par analogie avec ces données,on peut penser que les composés phénoliques agissent également sur l'efflux puisque dans le cas des individus préalablement traités par l'acide quinique, le TIBA ne manifeste pratiquement plus aucun effet (E_{TIBA} par rapport à E) (Figure 16)

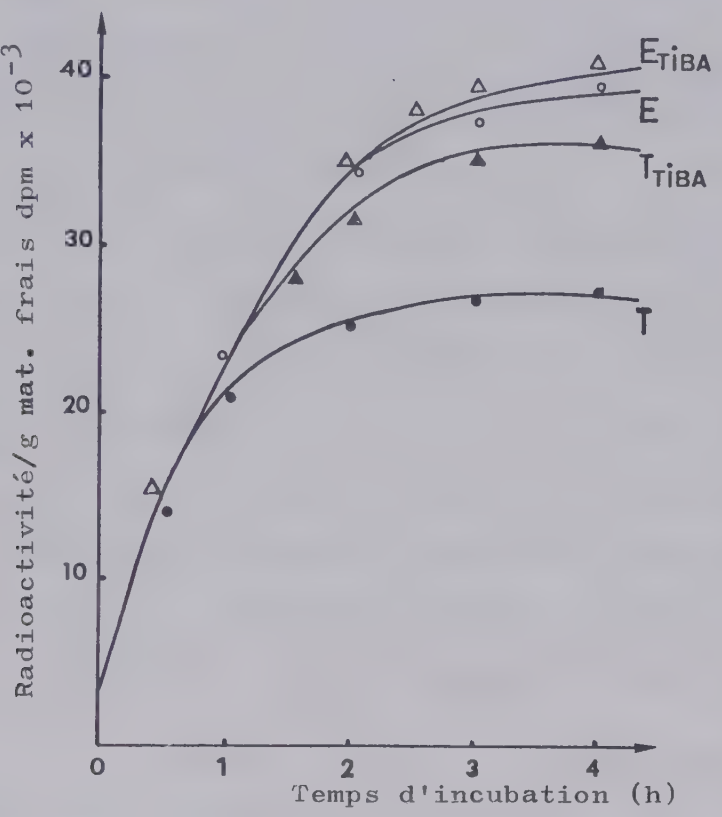


Figure 16 - Etude de la pénétration en fonction du temps de l'ANA ^{14}C dans les segments d'hypocotyles témoins (T) ou traités par l'acide quinique 4 x 10^{-2} M, 5 jours (E). Les segments sont mis à incuber avec de l'ANA ^{14}C (0,41 µCi dans 10 ml de milieu ; 0,75 x 10^{-6} M) seul (T et E) ou en présence de TIBA (10^{-5} M) (T_{TIBA}, E_{TIBA}).

Cependant, il ne semble pas que seul l'efflux soit affecté par le traitement. En effet, si on étudie plus spécifiquement la pénétration de l'ANA en supprimant l'efflux polarisé après action du TIBA, on constate que l'absorption du traceur est encore plus importante dans les segments traités (E_{TIBA} par rapport à T_{TIBA})

Il apparaît donc que la stimulation des teneurs en phénols entraîne simultanément une augmentation de la pénétration de l'ANA mais également un ralentissement de l'efflux.

Quelle importance attribuer aux variations de pH intracellulaire caractérisées en étudiant la pénétration du DMO dans les modifications du déplacement de l'auxine ? Si on suppose que cette diminution de pH concerne essentiellement le cytoplasme *, l'effet le plus direct paraît concerner le phénomène d'ionisation de la molécule , qui , comparativement aux lots témoins et par rapport à la forme non ionisée , va se traduire par une diminution relative des concentrations en auxine anionique, et par conséquent, selon la théorie chimiosmotique, par un ralentissement du transit à la partie basale des cellules (GOLDSMITH, I977). Cependant , si seul le cytoplasme était affecté par ces variations de pH, l'étude spécifique du phénomène de diffusion de l'ANA devrait vraisemblablement conduire à des résultats identiques à ceux caractérisés avec le DMO,ce qui n'est pas le cas puisque on observe au contraire un effet positif du traitement sur la diffusion de l'auxine. Ces observations suggèrent donc qu'au delà du cytoplasme, d'autres compartiments cellulaires sont probablement le siège de variations de pH.

Enfin,au delà d'une intervention du pH, et en se référant plus particulièrement aux expériences réalisées en présence de TIBA , on peut également évoquer un effet des phénols sur l'occupation de sites de fixation de l'auxine au niveau des protéines intervenant dans le transport polarisé de l'hormone.

CONCLUSION - DISCUSSION

Les résultats présentés dans ce chapitre apportent différents arguments en faveur de l'intervention des polyphénols dans le transport polarisé de l'auxine.

Si le rôle, sur le transport de l'auxine, de certains composés synthétiques de nature aromatique est signalé depuis longtemps : TIBA, DNP (NIEDERGANG-KAMIEN et LEOPOLD, 1957), dérivés chlorés et

---

*Pour des cellules d'Acer pseudoplatanus (KURKDJIAN et GUERN, I978) l'étude de la pénétration du DMO permet d'évaluer des modifications du pH cytoplasmique, car,en raison de son pK_a (6,3) et du caractère acide du milieu vacuolaire, la diffusion de ce marqueur n'est pas affecté dans certaines conditions (rapport volumes cytoplasme/ vacuole voisin de IO %)par des variations du pH de la vacuole.

iodés de l'acide benzoïque (KEITT et BAKER, 1966), l'influence des polyphénols naturels de la plante n'a que très rarement été évoquée. HASHIMOTO et WAKIMORI (1976) signalent l'effet inhibiteur sur le mouvement de l'AIA d'une famille de constituants phénoliques isolés à partir de Dioscorea batatas, les batatasines. Dans un travail récent, STENLID (1976) montre également que les flavonoïdes ralentissent le transport de l'ANA ; en ce qui concerne l'AIA, les résultats sont plus hétérogènes, certains composés ayant une action inhibitrice , d'autres favorisant au contraire sa translocation. Pour aborder ce type d'étude, ces auteurs utilisent des segments d'organes et STENLID insiste particulièrement sur les difficultés d'interprétation qui peuvent provenir des effets de blessures,notamment dans le cadre des interactions métabolisme phénols - AIA.

Chez Lycopersicum, j'ai retenu des plants dont seul le bourgeon est sectionné, ce qui minimise les effets de "stress". Dans ces conditions, on relève une action identique des polyphénols non seulement sur le mouvement de l'AIA mais aussi sur celui de l'ANA, ce qui montre que le métabolisme dégradatif de l'auxine naturelle ne semble pas à l'origine des réponses constatées.

En se référant aux données que l'on possède actuellement sur le mode de transport de l'auxine (mouvement métaboliquement actif), deux interventions possibles des composés phénoliques ont été envisagées :

- action directe selon un mécanisme identique à celui du TIBA (MORRIS et al., 1973) par fixation sur les sites de transport de l'auxine. Cependant, la recherche de "récepteurs" protéiques de l'AIA n'a pas permis de caractériser un mode de fixation spécifique compatible avec l'existence physiologique d'une association auxine - protéines (HERTEL et al., 1972),
- une action indirecte pouvant se traduire secondairement par des modifications du pH intracellulaire. Dans cette optique, l'étude du phénomène de diffusion du DMO a conduit à des résultats suggérant que consécutivement à l'augmentation des teneurs en composés phénoliques se produisait une diminution de la valeur du pH intracellulaire.

Dans la cellule,l'un des processus assurant la régulation du pH (RAVEN et SMITH, 1974) consiste en une secrétion de protons du cytoplasme vers les autres compartiments (vacuole, paroi). En raison des différences de potentiel existant de part et d'autre des membranes, ce mouvement nécessite un apport d'énergie ; l'origine en est encore

mal appréciée, mais elle pourrait être liée à la disponibilité en ATP. Les formes oxydées des polyphénols, qui ralentissent préférentiellement chez Lycopersicum le transport polarisé de l'auxine, pourraient intervenir dans un des processus générateur d'énergie (STENLID, 1970 ; Van SUMERE et al., I972) . Dès lors, on peut supposer que les composés phénoliques interagissent également dans le transfert des protons ce qui pourrait conduire à une diminution du pH cytoplasmique, mais aussi selon cette hypothèse ,à une augmentation des pH respectifs de la vacuole et de la paroi. En relation avec le caractère polarisé du transport de l'AIA , ces variations de pH se répercuteraient au détriment de la phase de secrétion polaire en favorisant le phénomène de diffusion de l'auxine :

- latéralement, au travers des cellules , à partir des tissus spécialisés dans le transport basipète vers d'autres assises où le mouvement de l'AIA s'effectue sans orientation précise ,
- dans la vacuole par l'intermédiaire du tonoplasme où des modifications éventuelles de pH en sens inverse de celles relevées dans le cytoplasme conduiraient à piéger la molécule.

Cette interprétation de l'effet des phénols par l'intermédiaire d'une modulation du pH cellulaire demeure actuellement à l'état hypothétique. Cependant, l'incidence d'une élévation du pH de la vacuole permettrait de mieux comprendre non seulement l'action favorable du traitement sur l'absorption de l'ANA mais également le ralentissement de la pénétration du DMO qui, en raison de son pK_a , apparaît moins sensible à l'effet de piège exercé éventuellement par le compartiment vacuolaire.

En résumé, les éléments de cette étude démontrent une action différente des polyphénols sur le transport passif du DMO et de l'ANA, et leur effet inhibiteur sur l'efflux actif de l'ANA dans des segments d'organes . En situation de conduction, au niveau des plants entiers, il est concevable que ce ralentissement de la conduction polarisée favorise le mouvement passif de l'auxine par diffusion; ce mouvement différé et cette redistribution à d'autres tissus créeraient localement des concentrations en AIA importantes pouvant affecter des processus physiologiques particuliers comme la division ou l'allongement cellulaire.

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES

Ce travail, qui s'inscrit dans le cadre de recherches plus générales menées au Laboratoire sur le métabolisme et les fonctions des composés phénoliques chez les végétaux supérieurs, a été entrepris pour tenter d'apporter de plus amples précisions sur les relations pouvant exister entre polyphénols et croissance végétale. A l'époque où il fut engagé, il y avait lieu, en effet, d'abandonner la conception ancienne selon laquelle ces substances représentaient de simples produits de déchets, de nombreuses informations leur attribuant des propriétés biologiques diversifiées. Cependant, une des principales difficultés provenait de l'absence d'expériences démontrant clairement leurs fonctions dans des cellules intactes.

C'est dans ce contexte que se situent les recherches entreprises chez Lycopersicum esculentum, mon objectif étant de préciser le rôle des polyphénols dans la croissance de plants intacts. Ma première démarche a consisté à définir un modèle d'étude qui tienne compte de cet impératif. Ce point acquis, je me suis efforcé de préciser dans un deuxième temps les modalités d'intervention des polyphénols en examinant plus particulièrement les interactions phénols - auxine.

L'apport de substances phénoliques exogènes à des organes ou tissus isolés fournit un nombre appréciable d'informations sur les propriétés potentielles des polyphénols, mais pour des raisons déjà évoquées, les données obtenues sont difficilement transposables au fonctionnement du végétal.

La possibilité de stimuler de façon modulable le pool phénolique de plants de Tomate m'a permis d'envisager ce problème sous un angle nouveau, en appréciant directement l'effet de l'augmentation provoquée sur la croissance.

Le traitement consiste en l'apport de précurseurs du métabolisme phénolique au niveau du système radiculaire de jeunes plants. L'acide quinique, qui peut s'accumuler de manière importante tout en subissant un renouvellement rapide chez les végétaux, a préférentiellement été utilisé.

Dans les conditions retenues, j'ai vérifié en suivant l'incorporation d'acide quinique radioactif et en comparant les quantités présentes dans les plants témoins et traités que le précurseur fourni est absorbé par le système radiculaire, puis véhiculé au niveau des parties aériennes. L'étude de son devenir fait ressortir que l'acide quinique est utilisé selon les voies classiques déjà précisées, chez ce végétal, par certains auteurs (FUCHS et De VRIES, 1968).

On note en effet:

- une utilisation de ce composé dans la synthèse d'acide shikimique, ce fait confirmant sa participation directe dans l'édification des unités phénoliques via l'acide shikimique,
- une mobilisation plus importante dans la formation de depsides, puis, secondairement comme le montrent les expériences effectuées en utilisant l'acide chlorogénique, comme précurseur dans la synthèse de produits finaux de type lignines.

Consécutivement à l'absorption d'acide quinique, il se produit simultanément une stimulation du pool phénolique et un ralentissement de croissance qui affecte non seulement la division mais aussi l'allongement cellulaire des parties aériennes.

Ce fait expérimental a été ensuite approfondi, et j'ai pu apporter des arguments permettant de relier les modifications de croissance à l'augmentation des polyphénols solubles :

- des réponses comparables au niveau de la croissance sont observées lors de l'apport de différents précurseurs du métabolisme phénolique, la stimulation des teneurs en polyphénols représentant dans chaque cas une conséquence du traitement,
- l'apport de molécules ne présentant aucune relation biogénétique avec les composés phénoliques reste sans action sur le pool phénolique de la plante et n'entraîne aucune modification de la croissance,
- la diminution de taille observée chaque fois que les teneurs en polyphénols sont augmentées apparaît, de plus, proportionnel à cette stimulation.

Ces observations permettent d'attribuer aux composés phénoliques une action dans le contrôle de la croissance chez Lycopersicum. Une réduction de la croissance végétale avait été précédemment observée à la suite de traitements provoquant une augmentation de la teneur en polyphénols (GELINAS et POSTLETHWAIT, 1969; RUSSEL et GALSTON, 1969) mais c'est la première fois qu'une corrélation est établie aussi nettement.

Le rôle des polyphénols dans la croissance végétale a souvent été associé à la régulation du métabolisme auxinique, par le jeu des interactions mono-diphénols vis-à-vis de l'AIA oxydase. Dans le cas de plants intacts, si dans de nombreuses situations des corrélations existent, aucune preuve ne démontre leur intervention selon ce mécanisme plutôt que sur des processus biochimiques plus généraux. Je me suis donc efforcé de comprendre leur modalité d'intervention chez Lycopersicum ; pour cela j'ai tenté d'apprécier les modifications subies par différentes familles de constituants, et d'évaluer d'éventuelles perturbations du contenu hormonal.

Les déterminations effectuées en estimant les teneurs en chlorophylles et en protéines montrent que le traitement ne bouleverse pas de manière importante le métabolisme fondamental.

Par contre,le fait de stimuler le pool phénolique s'accompagne inéluctablement de modifications dans la proportion respective de deux catégories de constituants de la paroi : diminution des teneurs en cellulose, augmentation concomittante de la fraction lignine.

Ces données suggèrent donc une intervention des composés phénoliques au niveau de la constitution et des propriétés mécaniques de la paroi (diminution des capacités d'extension lors de l'allongement cellulaire).

En ce qui concerne les effets du traitement sur le contenu hormonal, les expériences réalisées ont conduit à caractériser l'installation d'une situation hyperauxinique dans les parties aériennes.

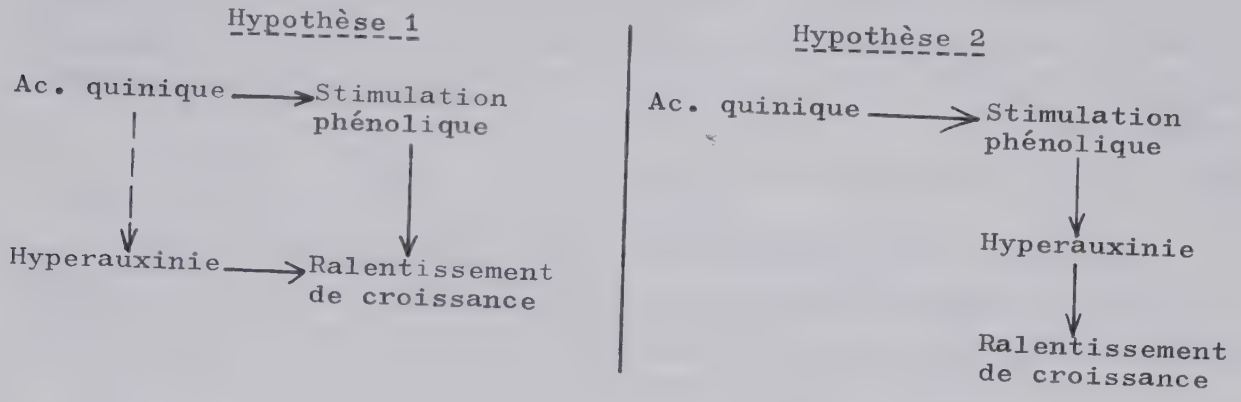
Ce fait,établi indirectement dans une approche préliminaire après apport exogène d'hormones (auxine, gibberelline, cytokinine), a par la suite été confirmé en comparant les teneurs en AIA de plants témoins et traités par l'acide quinique. Pour ces derniers, le traitement entraîne en effet une augmentation spectaculaire des teneurs en AIA dans les parties aériennes, sensiblement huit fois plus élevées (12e jour de traitement) que celles déterminées sur les plants témoins.

L'importance de cette stimulation se répartit, de plus, selon un gradient qui s'établit, corrélativement aux modifications de croissance, des zones les plus aériennes vers les organes souterrains où le taux auxinique est également affecté, mais dans des proportions moins importantes. Ces observations suggèraient une corrélation entre l'accumulation d'auxine et les modifications de croissance décelées au niveau des parties aériennes.

L'implication directe de cette situation hyperauxinique dans les modifications de taille a été démontrée en appréciant l'effet d'apports exogènes d'auxine :

- à des plants préalablement traités par l'acide quinique où des applications d'AIA accentuent le ralentissement de taille initial des lots traités,
- à des plants témoins qui subissent, pour des concentrations élevées, une réduction de croissance d'autant plus marquée que l'hormone est déposée en quantités importantes.

Consécutivement au traitement, il est donc possible de caractériser deux types de réponses - augmentation des teneurs en phénols mais aussi en AIA - qui paraissent étroitement impliquées dans les modifications de croissance observées. Le problème se posait de rechercher si les deux événements agissaient séparément (hypothèse 1) ou de manière coordonnée et séquentielle (hypothèse 2)



Différents arguments ont permis de relier l'état hyperauxinique à la production accrue en polyphénols, accréditant l'enchaînement des évènements décrits dans la deuxième hypothèse :

- en se référant au tryptophane qui ne subit aucune modification de ses teneurs après apport d'acide quinique ou de phénylalanine, il semble que les molécules de précurseur n'interviennent pas directement dans la synthèse d'AIA,
- l'augmentation du contenu en auxine s'observe dans le cas d'un traitement par un précurseur direct du métabolisme phénolique, l'acide cinnamique, qui ne présente aucun lien biogénétique avec l'AIA,

- enfin, on relève également la même observation pour des situations diverses (carences en bore, infection fongique) dans lesquelles la teneur en polyphénols se trouve également stimulée.

Dans ces conditions, il apparaît nettement que les composés phénoliques, chez la Tomate, exercent leur effet inhibiteur sur la croissance à travers l'établissement d'une situation hyperauxinique.

Le système expérimental ainsi défini, dont l'originalité réside dans la nette démonstration d'une situation hyperauxinique se prêtait à une évaluation nouvelle et plus approfondie du mode d'action des composés phénoliques dans le contrôle du contenu en auxine.

J'ai pu ainsi apporter des arguments expérimentaux en faveur de deux effets importants des polyphénols, concernant :

1 - la phase de dégradation de l'auxine dans laquelle les composés phénoliques manifestent des effets classiques de type "protecteur" d'auxine, en ralentissant la destruction oxydative de l'AIA. L'acide chlorogénique, dont la teneur est stimulée préférentiellement au cours du traitement, semble jouer un rôle prépondérant. Une étude des compétitions "acide chlorogénique - AIA" vis-à-vis de l'AIA oxydase a conduit à mieux comprendre le fonctionnement de ce système : l'acide chlorogénique se comporte comme un inhibiteur compétitif de l'auxine. En raison de son affinité largement supérieure pour le composé phénolique, l'enzyme oxyde celui-ci préférentiellement, la dégradation de l'AIA se déroulant ultérieurement.

In vivo, cette compétition entre les deux substances conduit non seulement à une augmentation des teneurs en AIA, mais aussi à l'apparition de produits d'oxydation de l'acide chlorogénique (Figure 17, page 126).

2 - le transport polarisé de l'hormone ; dans ce processus, les composés phénoliques inhibent la translocation des auxines (AIA ou ANA) des zones de synthèse apicales vers les organes souterrains où l'AIA est préférentiellement dégradé. Ce deuxième effet apparaît plus intéressant, car en dehors des travaux de STENLID (1976) sur des flavonoïdes, l'intervention des composés phénoliques naturels de répartition générale n'avait pas encore été rapportée.

Le ralentissement dans la conduction de l'auxine est associé à l'action préférentielle de formes phénoliques oxydées, de nature identique à celles résultant des interactions acide chlorogénique-AIA (Figure 17). Des expériences effectuées en présence de TIBA montrent que ces composés interviennent plus particulièrement en diminuant

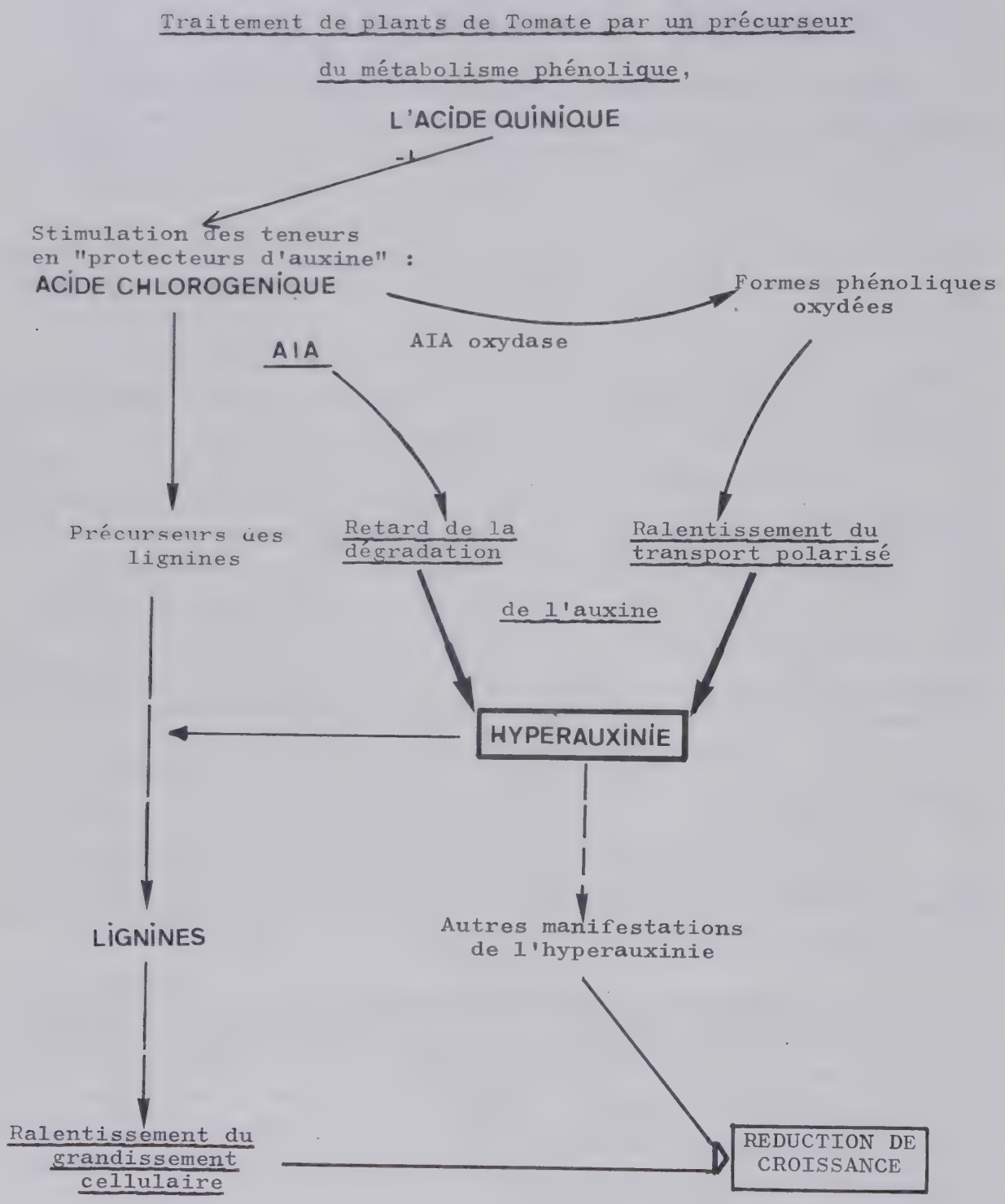


Figure 17 - Enchaînement présumé des différents événements conduisant à l'installation d'une situation hyperauxinique et à un ralentissement de croissance de plants de Tomate traités par l'acide quinique.

"l'efflux" à la partie basale des cellules. Une éventuelle compétition entre substances phénoliques et auxine au niveau des "récepteurs" impliqués dans le transport polarisé pouvait alors être envisagée. L'impossibilité de caractériser, chez Lycopersicum, des sites récepteurs de l'AIA n'a pas permis de vérifier le bien fondé de cette hypothèse qui, d'après les expériences réalisées en présence de TIBA, demeure cependant vraisemblable.

Dans le cas des plants dont la teneur en phénols est stimulée, des variations du pH intracellulaire pourraient favoriser les phénomènes de diffusion de l'auxine au détriment de la phase de secrétion polaire.

Il apparaît donc deux phénomènes -retard de la dégradation, ralentissement du transport de l'AIA- qui se développent progressivement dans le temps et qui en conjuguant leurs effets déterminent une stimulation des teneurs en auxine (Figure 17).

L'effet inhibiteur sur la croissance de doses hyperphysiologiques d'auxine a été signalé à de nombreuses reprises lors de l'allongement du système radiculaire (SCOTT, 1972), moins fréquemment dans les parties aériennes. En ce qui concerne le mode d'action de l'AIA selon cet aspect, de nombreux points demeurent obscurs. Cependant, on peut penser que l'auxine agirait comme dans les racines par production d'inhibiteurs endogènes ou bien de manière identique aux substances auxinomimétiques de synthèse utilisées en tant qu'herbicides (2,4 D) qui à fortes doses se comportent comme des poisons (MORELAND, 1967).

Les observations réalisées dans ce travail montrent que dans de telles situations hyperauxiniques, le processus de lignification pourrait s'opposer au grandissement cellulaire. Dans les parties aériennes, on peut supposer que l'AIA, exilé vers des assises cellulaires autres que celles assurant sa conduction polarisée intervienne, en particulier dans la région du xylème, en favorisant la différenciation des cellules contigües, ce qui expliquerait l'apparition de nouveaux éléments lignifiés dans les hypocotyles des plants traités.

La limitation des processus de croissance par la mise en place des lignines n'a été, en dehors de quelques travaux (WARDROP, 1964 ; WITHMORE, 1971) que très rarement évoquée. Cette étape de lignification se déroule en effet lorsque les cellules ont cessé de s'allonger, et il est difficile d'apprécier si elle représente une cause ou une conséquence d'un arrêt de la croissance.

Le système expérimental décrit dans ce travail concerne une situation où le processus de lignification se déroule de manière accélérée et précoce alors que les cellules n'ont sans doute pas atteint leur taille définitive, et s'accompagne d'une réduction de croissance. Par ailleurs, des observations réalisées après apport d'hormones exogènes permettent d'établir des corrélations inverses entre lignification et croissance. Ces données suggèrent donc l'implication de la lignification dans un arrêt prématuré de l'allongement cellulaire, mais différentes questions restent posées. En particulier dans quelle mesure des dépôts de lignines localisés dans des tissus spécialisés peuvent-ils entraver l'extension des cellules voisines ? Pour les assises dont la finalité n'est pas de se différencier en lignines, les modifications ne pourraient-elles pas s'expliquer néanmoins par une présence discrète et difficilement perceptible d'éléments lignifiés qui affecteraient les propriétés mécaniques de la paroi ? Enfin, d'une manière plus générale, quels sont les équilibres hormonaux et les autres facteurs qui conduisent un végétal à former des lignines à un moment donné de sa vie ? Ces différents problèmes rejoignent les préoccupations de chercheurs travaillant sur le déterminisme et le contrôle de la lignification encore mal appréciés à l'heure actuelle.

Les éléments de cette étude démontrent donc, chez Lycopersicum, l'intervention des composés phénoliques dans l'installation d'une situation hyperauxinique due en particulier à des modifications dans le transport polarisé de l' AIA. Ainsi, soit dans les conditions normales de fonctionnement, soit dans les états de " stress " pour lesquels les teneurs en phénols sont particulièrement stimulées ces composés pourraient jouer le rôle d'intermédiaire dans l'établissement de concentrations locales en auxine et être à l'origine de réponses morphogénétiques.

PERSPECTIVES DE TRAVAIL

En conclusion,à la faveur de ce travail, des informations nouvelles ont pu être apportées sur le mode d'inhibition exercé par les composés phénoliques dans les processus de croissance. L'apport essentiel concerne :

- la définition d'un système expérimental permettant d'envisager, dans le cas de plants intacts, les modalités d'action des composés phénoliques,
- la mise en évidence d'une situation hyperauxinique par l'intermédiaire,notamment,d'un effet inhibiteur des composés phénoliques dans le transport polarisé de l'AIA.

Parmi les prolongements de cette étude, deux directions me paraissent devoir retenir plus particulièrement l'attention.

1 - Poursuite des recherches sur l'évaluation du rôle physiologique des polyphénols dans la croissance

Malgré ma préoccupation constante d'évaluer, in vivo, les différents niveaux d'intervention des polyphénols, (métabolisme, transport de l'AIA) une meilleure connaissance des interactions entre les composés phénoliques et l'auxine nécessite actuellement des précisions sur la localisation des diverses réactions invoquées. Quels que soient les niveaux précédents envisagés, l'action de ces composés est essentiellement liée à l'augmentation globale de leurs teneurs (acide chlorogénique) ou de celles de leurs produits de transformation (formes oxydées, lignines). Leur intervention est donc à relier en grande partie aux problèmes plus généraux de l'accumulation et du transfert de ces métabolites entre les différents compartiments cellulaires.

En particulier, leur présence accrue dans le ou les compartiments comportant une activité AIA oxydase devrait être appréciée pour conclure définitivement à leur rôle en tant que protecteur d'auxine.

La caractérisation des lieux de stockage, l'étude des mécanismes régissant les transferts qui représentent,à l'heure actuelle,des directions de recherche déjà engagées dans notre Laboratoire pourraient faire progresser ces connaissances.

2 - Valorisation du modèle expérimental et des connaissances acquises dans une étude plus large sur les fonctions des composés phénoliques

Au-delà de leur rôle dans les phénomènes de croissance, d'autres aspects concernant les fonctions des composés phénoliques pourraient être envisagés, à mon sens, en utilisant ce modèle d'étude :

- rôle dans la rhizogénèse : pour des traitements en acide quinique ou en phénylalanine de longue durée, on peut en effet observer à la base de l'hypocotyle des protubérances abondantes, point de départ de nombreuses radicelles qui vont s'enraciner par la suite.

- rôle en tant qu'agents anti-infectieux, une étude déjà entreprise chez Lycopersicum ayant montré que les polyphénols étaient directement impliqués dans un phénomène de résistance à une attaque fongique par Fusarium oxysporum (CARRASCO et al., 1977 ; CARRASCO et al., 1978).

Les connaissances acquises dans ce travail devraient apporter maintenant des éléments intéressants pour aborder l'étude du mode d'action des phénols, en particulier à travers l'intervention éventuelle d'une situation hyperauxinique susceptible d'agir dans les deux processus précités.

Enfin, parallèlement à ces deux thèmes de portée générale, différents points précis mériteraient d'être approfondis :

- l'intervention des lignines dans le ralentissement de l'allongement cellulaire, fortement suggérée par les observations effectuées dans ce travail,

- la recherche d'une compétition entre composés phénoliques et AIA au niveau des sites de fixation de l'auxine (on pourrait utiliser pour cela des récepteurs protéiques isolés de coléoptiles de Maïs plus facilement caractérisables),

- le mode d'intervention des composés phénoliques dans les modifications de pH cytoplasmique et la signification précise de ces variations de pH dans le transport polarisé de l'hormone.

ANNEXE

I - PROTOCOLE DE DOSAGE DU TRYPTOPHANE

A - Méthode d'obtention de la tryptophanase

B - Dosage du tryptophane

II - METHODES DE DOSAGE DES SUBSTANCES AUXINIQUES

A - Protocoles d'extraction et de purification

B - Dosage spectrophotofluorimétrique de l'AIA

C - Dosage spectrophotométrique de l'APA après chromatographie sur colonne de Polyclar

III - TECHNIQUES UTILISEES DANS LA RECHERCHE DES RECEPTEURS PROTEIQUES DE L'AUXINE

A - Obtention de différentes fractions susceptibles de fixer l'auxine

B - Fixation de l'auxine après incubation en présence de protéines solubles ou membranaires

C - Fixation de l'auxine par passage des protéines sur Sephadex

I - PROTOCOLE DE DOSAGE DU TRYPTOPHANE

A - Méthode d'obtention de la tryptophanase

La tryptophanase a été isolée à partir d'une souche d'*Escherichia coli* dérivée K 12 (thymine$^-$, leucine$^-$) fournie par J.M. LOUARN (Laboratoire de Génétique de l'Université Paul Sabatier).

1.- Cultures d'*Escherichia coli*

Les cultures sont réalisées sur des milieux liquides complets* dans des fioles de Fernbach de 2 litres contenant 1 litre de milieu. L'ensemencement est effectué de façon stérile, à partir d'une préculture réalisée la veille contenant 10^7 cellules/ml. On introduit 3 ml de milieu de préincubation par litre de milieu complet. On place les fioles dans une pièce thermostatée à 25° C sur un agitateur oscillant et on laisse incuber 48 heures. La croissance des bactéries est suivie par mesure de la densité optique à la longueur d'onde de 550 nm (dans les conditions retenues, une D.O. de 0,1 correspondant à 10^6 cellules/ml). Les cellules sont récoltées en fin de phase exponentielle de croissance : on obtient environ 10^7 à 10^8 cellules/ml de milieu.

2.- Extraction de la tryptophanase

Les différentes étapes de l'extraction ont été réalisées à des températures comprises entre 0 et 4° C.

Les milieux de culture obtenus précédemment sont soumis à une centrifugation de 30 minutes à 1 500 g (centrifugeuse réfrigérée MSE H.S. 18). Les culots cellulaires sont lavés à plusieurs reprises par l'eau distillée, puis mis en suspension dans 10 ml de tampon phosphate M/50 de pH 7 et le contenu des cellules libéré au sonicateur à ultrasons MSE (30 minutes à 1,5 ampères). La suspension obtenue est centrifugée 30 minutes à 20 000 g (centrifugeuse Sorvall) et le culot, repris par le même tampon, soumis à nouveau à l'opération précédente. Les surnageants sont réunis puis lyophilisés.

3.- Purification de la tryptophanase

Après avoir repris le résidu de lyophilisation par du tampon phosphate M/50 de pH 7, l'extrait est successivement purifié par précipitation par le sulfate d'ammonium (à 80 % de saturation) et dessalage sur gel de Sephadex G 25 "fine". La solution protéique obtenue est conservée à -20° C.

---

*Composition des milieux complets (GUNSALUS et al., 1955)
1 litre de milieu complet contient : 10 g de tryptone , 10 g d'extrait de levure, 5 g de $K_2 HPO_4$, 1 g de glucose, 0,02 g de thymine et 0,02 g de leucine.

B - Dosage du tryptophane

1.- Extraction et purification du tryptophane

Malgré la spécificité d'action de la tryptophanase, le tryptophane extrait du végétal a été partiellement purifié, certains composés naturels (plus particulièrement des composés phénoliques) pouvant modifier l'activité de l'enzyme. Pour cela je me suis inspiré du protocole de WIDHOLM (1972) : l'extrait aqueux amené à pH 3 par HCl 0,1 M est fixé sur Dowex 50 X 8, 100-200 mesh, forme H^+ et après rinçage par H_2O, les acides aminés élués par 100 ml de NH_4OH 1 N. L'éluat évaporé à sec est repris par un volume connu d'H_2O.

2.- Transformation enzymatique du tryptophane et estimation de la quantité d'indole formée

La composition des milieux réactionnels et les conditions standards sont indiquées dans le tableau XXXII. L'enzyme est utilisée en excès à une concentration telle que tout le tryptophane soit dégradé. Un essai réalisé sans enzyme permet d'éliminer les interférences dues aux substances indoliques présentes dans le végétal.

Après action enzymatique, on peut estimer le tryptophane en déterminant la quantité d'indole libérée : ce dernier est extrait quantitativement par le toluène (2 ml) puis dosé par colorimétrie après action du réactif à la paradiméthylaminobenzaldéhyde (méthode de GUNSALUS et al., 1955).

TABLEAU XXXII

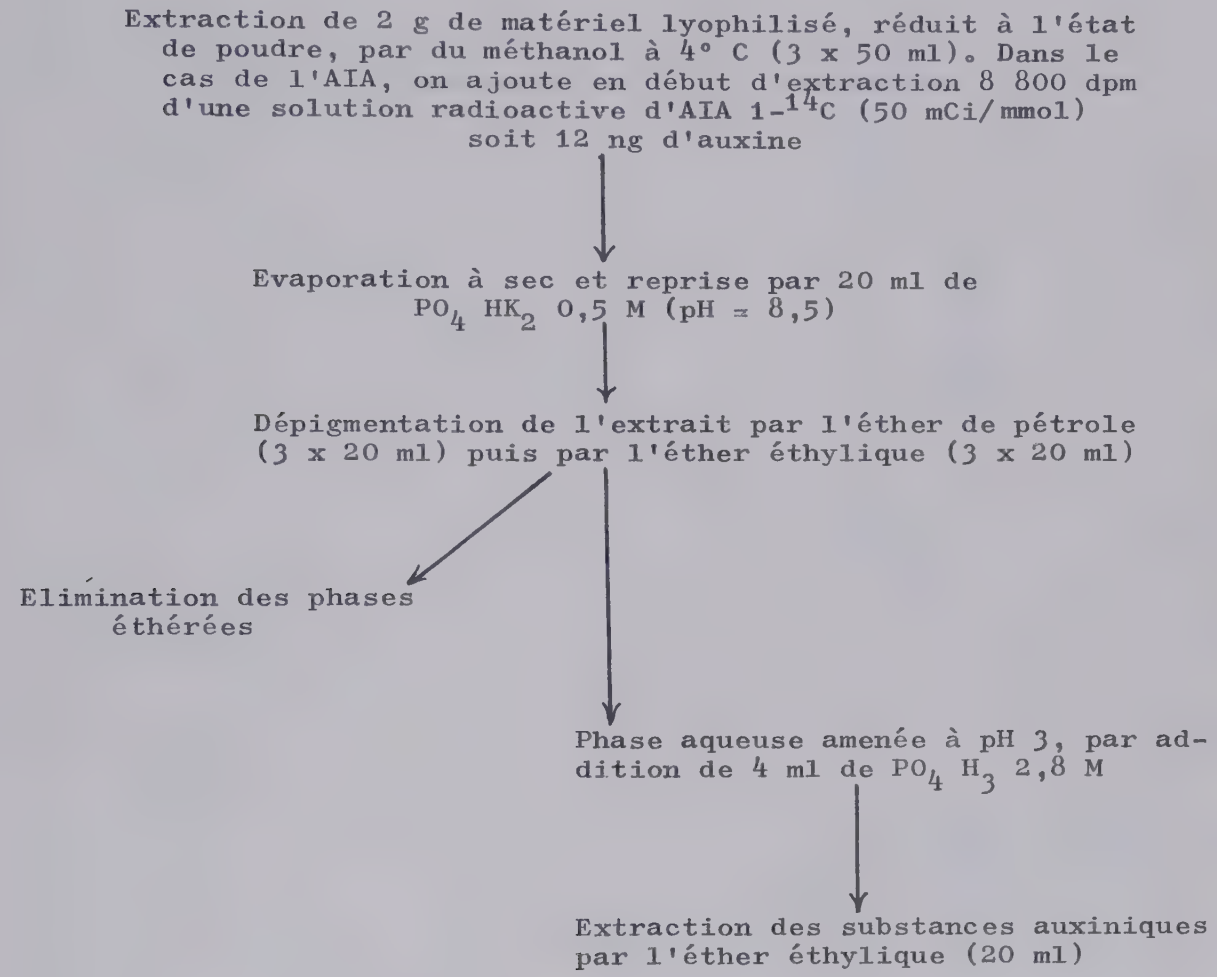
Composition des milieux réactionnels (en ml)

	Essai	Témoin
Extrait enzymatique (tryptophanase)	1	-
Pyridoxal phosphate 100 µg/ml	0,2	0,2
Tampon phosphate M de pH 8,3	0,2	0,2
Eau distillée	0,4	1,4
équilibration : 10 minutes à 37° C		
Solution de tryptophane à doser	0,2	0,2
incubation : 30 minutes à 37° C		
arrêt de la réaction par 0,2 ml d'acide trichloracétique à 100 %		

II - METHODES DE DOSAGE DES SUBSTANCES AUXINIQUES

A - Protocoles d'extraction et de purification

On extrait et on purifie les substances auxiniques (AIA, APA) selon le diagramme opérationnel reporté ci-dessous :



A ce stade :

- l'AIA subit une nouvelle série d'extractions sélectives à pH 8,5 (20 ml de PO_4 HK_2 0,05 M), puis par l'éther éthylique (20 ml) à pH 3,0 (addition de 4 ml de PO_4 H_3 0,28 M à la phase aqueuse précédente). La phase éthérée est évaporée à sec et le résidu repris par 6 ml de méthanol anhydre.

- l'APA, après évaporation de l'éther, est purifié par chromatographie préparative sur papier Whatman N° 3 dans le solvant de NITSCH et NITSCH (1955) : isopropanol - eau - NH_4OH à 28 % (80-19,9-0,1). Le composé, localisé dans la zone de Rf comprise entre 0,55 et 0,65, est élué par du méthanol, l'éluat évaporé à sec puis repris par 1 ml d'H_2O acidifiée à pH 3,5 par HCl 0,1 N.

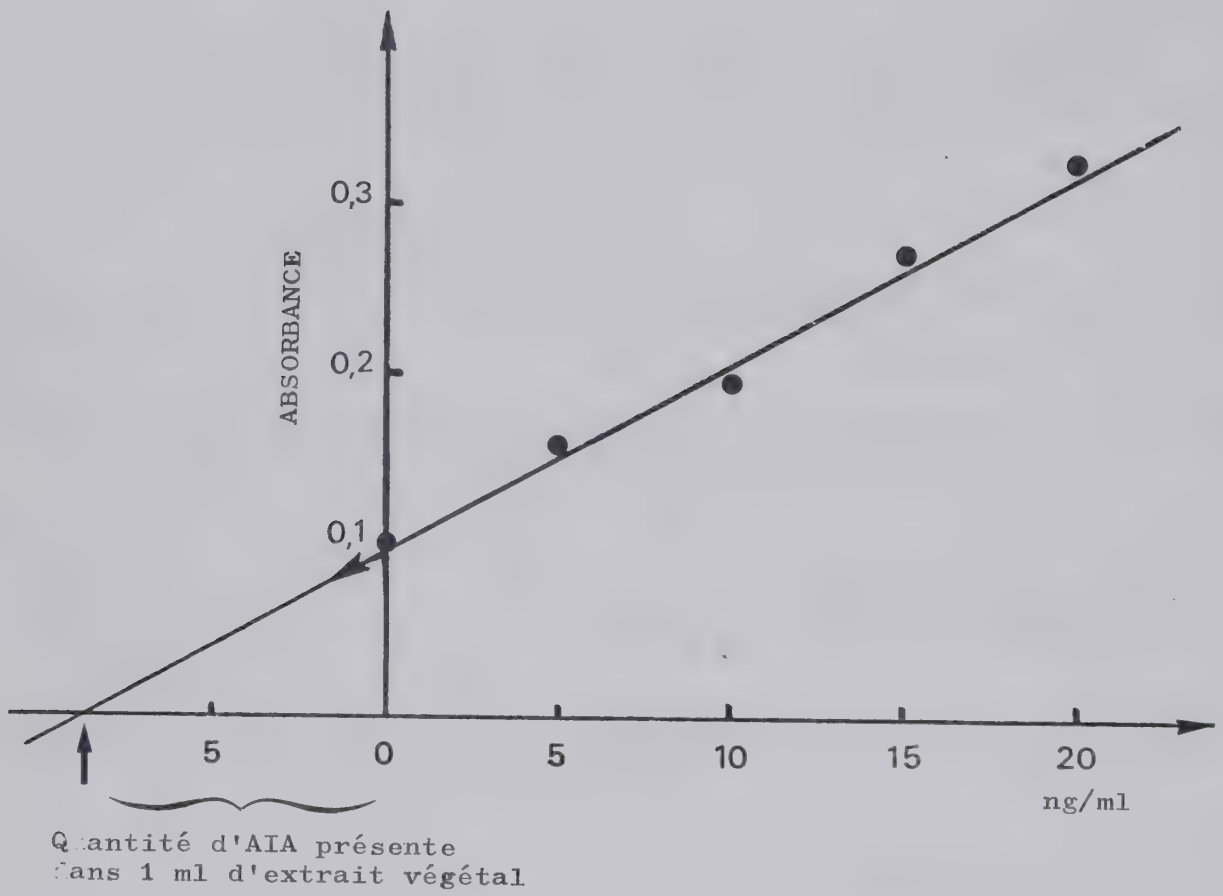


Figure 18 - Mode d'appréciation de la quantité d'auxine présente dans l'extrait végétal.

B - Dosage spectrophotofluorimétrique de l'AIA

Cette technique repose sur la détermination par spectrophotofluorimétrie de l'indole α pyrone, après transformation de l'auxine en présence d'anhydride acétique et d'acide trifluoroacétique.

La droite permettant d'étalonner la fluorescence émise par ce composé utilisé à différentes concentrations, passe par l'origine mais la pente n'est pas constante. On est donc obligé de réaliser pour chaque détermination une courbe étalon en ajoutant, à différentes fractions de 1 ml de l'extrait initial, des surcharges en AIA inerte (0, 5, 10, 15, 20 ng/ml). Chaque essai est évaporé à sec puis traité par 200 µl d'un mélange anhydride acétique - acide trifluoroacétique (1-1 V/V). Après 10 minutes d'action, on arrête la réaction par addition de 3 ml d'H_2O et on détermine immédiatement à 480 nm la fluorescence émise provenant de l'excitation à 450 nm de la molécule d'indole α-pyrone (les mesures sont effectuées à l'aide d'un "équipement spectrophotofluorimétrique" du Laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie du C.N.R.S. de Toulouse).

En présence d'H_2O, l'indole α-pyrone se dégrade et au bout de 2 heures le composé est pratiquement détruit ; une nouvelle estimation de la fluorescence des différents essais permet d'évaluer d'éventuelles interférences dues à des substances parasites. En extrapolant la droite étalon ainsi obtenue à l'axe négatif des abcissses (Figure 18), il est alors possible de déterminer la quantité d'AIA présente dans le végétal.

Parallèlement aux déterminations précédentes, on mesure la radioactivité d'une fraction aliquote de 1 ml de l'extrait initial afin d'estimer les pertes en AIA subies au cours des différentes étapes de purification. Enfin, il est nécessaire de déduire des valeurs ainsi corrigées la quantité d'AIA radioactif (soit 12 ng) apportée lors de l'extraction.

C - Dosage spectrophotométrique de l'APA après chromatographie sur colonne de Polyclar

On fixe la solution aqueuse d'APA sur une colonne de Polyclar (9 x 1 cm) équilibrée dans l'eau acidifiée par HCl 0,1 N à pH 3,5. La chromatographie est développée dans le solvant d'équilibration et l'effluent recueilli par fractions de 2 ml à l'aide d'un collecteur "SV". Le composé, repéré par la mesure de l'absorbance à 228 et 260 nm (spectrophotomètre Beckman, modèle DU) est alors recueilli dans un volume d'élution de 6 ml (Figure 19). Après analyse, l'estimation du rapport $\frac{DO : 228\ nm}{DO : 260\ nm}$ compris entre 4 et 5 fournit, dans le cas

d'un extrait végétal, un critère permettant de vérifier la pureté de la substance isolée. La quantité d'APA est alors déterminée par référence à des courbes étalons établies à 228 et 260 nm à partir du produit commercial.

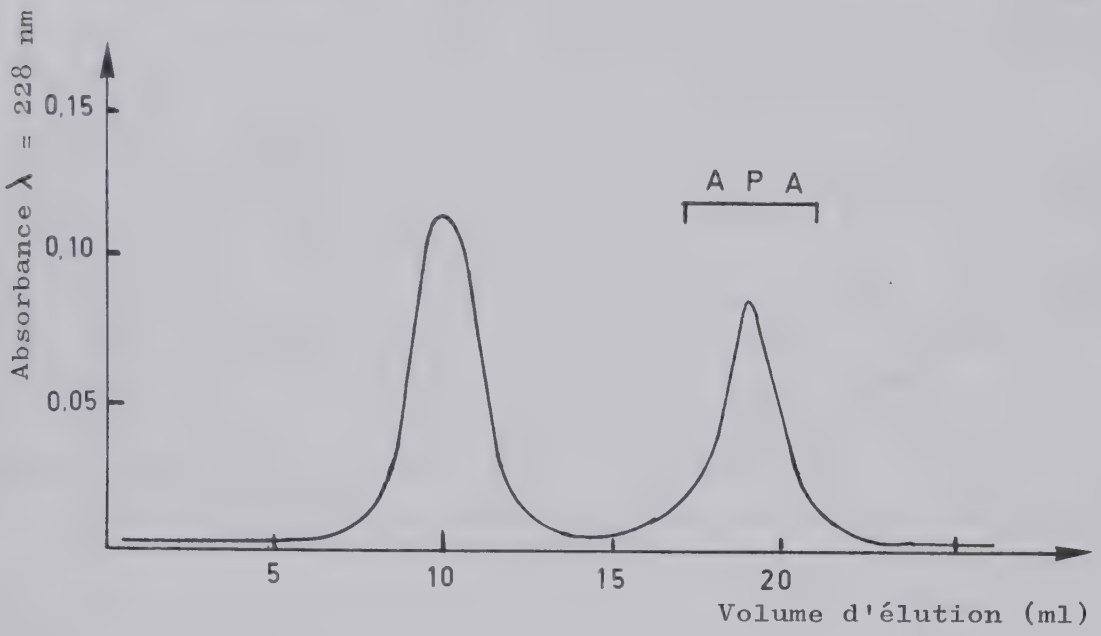


Figure 19 - Elutogramme obtenu après purification de l'acide phénylacétique sur colonne de Polyclar. Dans le cas d'un extrait végétal, on relève la présence, en début d'élution, d'un composé identifié à l'acide phényllactique.

III - TECHNIQUES UTILISEES DANS LA RECHERCHE DES RECEPTEURS PROTEIQUES DE L'AUXINE

A - Obtention de différentes fractions susceptibles de fixer l'auxine

Ce fractionnement repose sur les protocoles de IHL (1976) et de RAY et DOHRMANN (1977), utilisés respectivement pour obtenir des protéines du "cytosol" et des membranes capables de fixer l'auxine.

Des tiges (20 g) de plants âgés de 10 jours sont broyées dans un mortier en porcelaine pendant 1 minute en présence d'un milieu (20 ml) contenant : saccharose 0,25 M - EDTA 1 mM - $MgCl_2$ 0,1 mM - Tris HCl pH 8, 50 mM. L'homogénat est filtré à travers quatre épaisseurs de gaze, et le filtrat centrifugé 15 minutes à 2 000 g (Beckman J 21 B). Une nouvelle centrifugation du surnageant à 120 000 g (ultracentrifugeuse Spinco modèle L) permet de séparer les membranes (culot) des protéines du cytosol (surnageant).

Dans le cas où la recherche des récepteurs s'effectue sur la fraction membranaire, celle-ci est tour à tour reprise dans un milieu de lavage*, puis après centrifugation à 120 000 g remise en suspension dans le milieu d'incubation** (1 ml de milieu pour 0,5 g de matériel frais). Dans certaines expériences, les protéines des membranes sont extraites 30 minutes à froid par le Triton X 100 à 1 % (1 ml pour 20 g de matériel frais) qui, dans ces conditions, permet de solubiliser, à partir des membranes de coléoptiles de Maïs, 90 % des sites de fixation de l'auxine (DOHRMANN et RAY, 1976).

Avant de mesurer la fixation de l'auxine, les protéines du "cytosol" sont purifiées par passage sur gel de Sephadex G 25 préalablement équilibré dans le tampon Tris-HCl 0,01 M de pH 6,9 contenant $CaCl_2$ 0,001 M (IHL, 1976).

B - Fixation de l'auxine après incubation en présence de proteines solubles ou membranaires

A 2 ml de la solution protéique ou de la suspension membranaire ajustée à pH 5,5 (RAY et DOHRMANN, 1977) on ajoute dans les tubes à centrifuger l'hormone radioactive ($0,7 \times 10^{-7}$ M ; 61 mCi/mmol). Dans une incubation témoin, on introduit en plus de l'hormone radioactive une quantité d'hormone inerte à une concentration 10^3 supérieure (HERTEL et al., 1972). On laisse incuber 5 minutes à 0° C.

Lorsqu'on utilise la fraction membranaire, les tubes sont centrifugés 30 minutes à 20 000 g dans une centrifugeuse Sorvall SS-1 (NORMAND et al., 1975). Le surnageant est délicatement prélevé, les tubes égouttés 10 minutes sur papier filtre, et les culots membranaires repris par 1 ml de méthanol. Au bout d'une heure, temps au bout duquel la solubilisation de l'auxine éventuellement liée est complète (RAY et DHORMANN, 1977), le méthanol est transféré dans des flacons de comptage en présence de mélange scintillant (Unisolve, Packard).

La recherche d'une fixation de l'auxine sur les protéines du "cytosol" est effectuée en utilisant la technique décrite par IHL (1976). On utilise du charbon activé (Ultrasorb S.C) que l'on traite par le tampon Tris-HCl 0,01 M pH 6,9 contenant $CaCl_2$ 0,001 M ; on centrifuge à 600 g, puis on élimine le surnageant. Cette opération répétée à 3 reprises permet de se débarrasser des particules qui ne

---

* Saccharose 0,25 M - $MgCl_2$ 0,5 mM - tampon citrate de sodium pH 6 10 mM.

** Saccharose 0,25 M - $MgCl_2$ 5 mM - tampon citrate de sodium pH 5,5 10 mM.

sédimentent pas. A 150 mg de charbon préalablement traité, on ajoute 1 ml du milieu d'incubation. Les essais sont agités puis centrifugés 3 minutes à 600 g. L'auxine radioactive libre est absorbée sur le charbon ; la détermination de la radioactivité du surnageant permet d'évaluer la quantité d'auxine fixée à des protéines.

C - Fixation de l'auxine par passage des protéines sur Sephadex

Ce mode d'approche s'inspire du protocole décrit par DOHRMANN et RAY (1976). On utilise une colonne de Sephadex G 25 ayant un volume "mort" voisin de 0,5 ml et préalablement équilibrée à 4° C avec du tampon citrate de sodium pH 5,5 10 mM contenant : saccharose 250 mM - SO_4Mg 5 mM - Triton X 100 1 % - ^{14}C ANA($0,7 \times 10^{-7}$ M, 61 mCi/mmol). Le mélange précédent sert également de solvant d'élution. Une fraction aliquote (0,3 ml) de la solution des protéines membranaires extraites par le Triton est amenée à une concentration en ^{14}C ANA identique à celle du milieu d'élution, puis déposée sur la colonne. Durant leur passage à travers le Sephadex, les protéines éluées déplacent les molécules d'auxine qui viennent se fixer sur les sites récepteurs en les saturant. Par rapport à la radioactivité de "base" due au ^{14}C ANA qui sature la colonne, la sortie des protéines coïncide donc avec une augmentation de la radioactivité, suivie immédiatement après l'élution du volume mort d'une diminution, les deux vagues correspondant à la fraction en ^{14}C ANA prise en charge par les récepteurs (Figure 20).

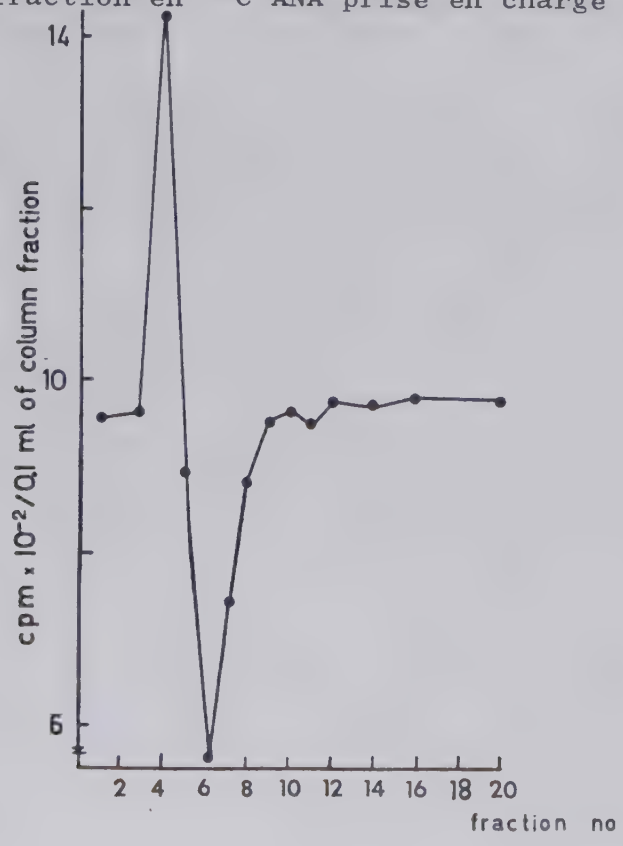


Figure 20

Diagramme d'élution du complexe protéines - ANA après Sephadex G 25 (selon DOHRMANN et RAY, 1976).

BIBLIOGRAPHIE

ABERG B. et JOHANSSONN I., 1969 - Studies on plant growth regulators. XXIV. Some phenolic compounds. Lantbrukshögsk. Ann., 35, 3-27.

ALIBERT G., 1973 - Séparation et dosage automatisés des acides phénoliques végétaux par chromatographie sur colonne de Polyclar et spectrophotométrie dans l'ultra violet. J. of Chromatogr., 80, 173-185.

ALIBERT G., 1975 - Les acides phénoliques et leur métabolisme chez Quercus pedunculata Erh. Thèse Doct. Sci. nat., Toulouse.

ALIBERT G., MARIGO G. et BOUDET A.M., 1969 - Recherches sur la biosynthèse des composés aromatiques chez les végétaux supérieurs. Identification des acides phénoliques de Quercus pedunculata Ehrh. Physiol. vég., 7, 57-68.

ANDERSEN R.A. et SOWERS J.A., 1968 - Optimum conditions for bonding of plant phenols to insoluble polyvinylpyrrolidone. Phytochemistry, 7, 293-301.

ANDERSON J.W. et ROWAN K.S., 1967 - Extraction of soluble leaf enzymes with thiols and other reducing agents. Phytochemistry, 6, 1047-1056.

ANDREAE W.A. et ANDREAE S.R., 1953 - Studies on indoleacetic acid metabolism. I. The effect of methyl umbelliferone, maleic hydrazide and 2,4-D on indole acetic acid oxidation. Can. J. Bot., 31, 426-437.

ANDREAE W.A. et COLLET G., 1968 - Biochemistry and physiology of plant growth substances. In . Proc. 6th Int. Conf. Plant Growth substances, éd., WIGHTMAN F. & SETTERFIELD G., Ottawa Runge, pp. 553-561.

ARNTZEN C.J., FALKENTHAL S.V., BOBIK S., 1974 - Inhibition of photophosphorylation by kaempferol. Plant Physiol., 53, 304-306.

BARDINSKAJA M.S., PRUSAKOVA L.D. et SCHUBERT T.A., 1962 - Les régulateurs de croissance de nature polyphénolique. Dokl. Akad. Nauk. S.S.S.R., 142, 222-225.

BARZ W., 1977 - Degradation of polyphenols in plants and plant cell suspension cultures. Physiol. vég., 15, 261-277.

BASTIN M., 1966 - Root initiation, auxin level and biosynthesis of phenolic compounds. Photochem. and Photobiol., 5, 423-429.

BASU R.N., BOSE T.K., ROY B.N. et MUKHOPADHYAYA A., 1969 - Auxin synergists in rooting of cuttings. Physiol. Plant., 22, 649-652.

BERGMANN L., 1964 - Der Einfluss von Kinetin auf die Ligninbildung und- differenzierung in Gewebekulturen von Nicotiana tabacum. Planta, 62, 221-254.

BETZ A., 1963 - Ascorbinsäure NADH Cystein und Glutathion hemmen den durch Peroxydase katalysierten oxydativen Abbau von β-Indolylessigsäure. Z. Bot., 51, 424-433.

BLANK G.E. et SONDHEIMER E., 1969 - The influence of polyphenols on potato phosphorylase. Phytochemistry, 8, 823-826.

BONNEMAIN J.L., 1971 - Transport et distribution des traceurs après application de AIA-2 ^{14}C sur les feuilles de Vicia faba. C. R. Acad. Sci., Paris, 273, 1699-1702.

BONNEMAIN J.L. et BOURBOULOUX A., 1973 - The transport and metabolism of ^{14}C indole-acetic acid in intact plants. Transactions of the 3rd Symposium on accumulation and translocation of nutrients and regulators in plant organisms, Warszawa, May 14th - 18th pp. 207-214.

BONNER J. et GALSTON A.W., 1944 - Toxic substances from the culture media of guayule which may inhibit growth. Bot. Gaz., 106, 185-198.

BONNER J. et BANDURSKI R.S., 1952 - Studies on the physiology, pharmacology and biochemistry of the auxin. Annu. Rev. Plant Physiol., 3, 59-86.

BOTTOMLEY W., SMITH H. et GALSTON A.W., 1966 - Flavonoid complexes in Pisum sativum. III. The effect of light on the synthesis of kaempferol and quercetin complexes. Phytochemistry, 5, 117-123.

BOUDET A. , 1968 - Synthèse biologique d'acide quinique ^{14}C uniformément marqué. J. of Labelled compounds, 4, 139-146.

BOUDET A.M., 1972 - Les acides quinique et shikimique et leur métabolisme chez les végétaux supérieurs. Thèse Doct. Sci. nat., Toulouse.

BOUDET A. et GADAL P., 1965 - Sur l'inhibition des enzymes par les tannins des feuilles de Quercus sessilis Ehrh. Isolement des tannins. C. R. Acad. Sci., Paris, 260, 4057-4060.

BOUDET A., MARIGO G. et ALIBERT G., 1967 - Recherches sur la biosynthèse et le métabolisme des composés aromatiques chez les végétaux supérieurs. Variations des teneurs en acides quinique et shikimique dans les feuilles de Quercus pedunculata Ehrh. au cours d'une année de végétation. C. R. Acad. Sci., Paris, 265, 209-212.

BOUILLENNE R., 1964 - Aspects physiologiques de la formation des racines. Bull. Soc. Roy. Belgique, 95, 193-204.

BRODA B., 1966 - Inhibition of α and β amylase by coumarin and caffeic acid. Acta Pol. Pharm., 23, 577-580.

BRUINSMA J., 1961 - A comment on the spectrophotometric determination of chlorophyll. Biochim. Biophys. Acta, 52, 576-578.

BRZOZOWSKA J., HANOWER P. et TANGUY J., 1973 - Polyphénols des feuilles de cotonniers et influence sur leur composition d'un choc hydrique ou nutritionnel. Phytochemistry, 12, 2353-2357.

BURTON K., 1956 - A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem. J., 62, 315-323.

CABANNE F., MARTIN-TANGUY J., MARTIN C. et PERDRIZET E., 1975 - Composés phénol-polyamines. Infection virale et floraison. Compte rendu de l'Assemblée Générale Annuelle du Groupe POLYPHENOLS, Gargnano sul Garda, Italie, pp. 142-148.

CANDE W.Z., GOLDSMITH M.H.M. et RAY P.M., 1973 - Polar auxin transport and auxin-induced elongation in the absence of cytoplasmic streaming. Planta, 111, 279-296.

CANDE W.Z. et RAY P.M., 1976 - Nature of cell-to-cell transfer of auxin in polar transport. Planta, 129, 43-52.

CARRASCO A., 1977 - Répercussions d'une stimulation provoquée du contenu phénolique de Lycopersicon esculentum Mill. sur la résistance à la fusariose. Thèse Doct. spé. Toulouse.

CARRASCO A., BOUDET A.M. et MARIGO G., 1978 - Enhanced resistance of tomato plants to Fusarium by controlled stimulation of their natural phenolic production. Physiological Plant Pathology, 12, 225-232.

CARRASCO A., MARIGO G. et BOUDET A.M., 1977 - Induction d'une résistance à la fusariose par augmentation du contenu phénolique chez Lycopersicum esculentum. C..R. Acad. Sci., Paris, 284, 1801-1804.

CHERRY J.H., 1962 - Nucleic acid determination in storage tissues of higher plants. Plant Physiol., 37, 670-678.

CHOUARD P., 1952 - Cultures sans sol. La Maison rustique éd., Paris.

CHRISTIE A.E. et LEOPOLD A.C., 1965 - On the manner of triiodobenzoic acid inhibition of auxin transport. Plant Cell Physiol., 6, 337-345.

CLELAND C.F. et AJAMI A., 1974 - Identification of the flower-inducing factor isolated from aphed honeydew as being a salicylic acid. Plant Physiol., 54, 904-906.

COLONNA J.P. et BOUDET A.M., 1971 - Etude cinétique de l'incorporation des acides ^{14}C quinique et ^{14}C cinnamique dans la molécule d'acide chlorogénique des tissus foliaires du caféier (Coffea Dewevrei de Wild et Durand, race C. Excelsa A. Chev.). C. R. Acad. Sci., Paris, 272, 952-955.

COME D., 1967 - L'inhibition de germination des graines de pommier non dormantes .Rôle possible des phénols tégumentaires. Thèse Sci. nat. Paris.

CORCORAN M.R., GEISSMAN T.A. et PHINNEY B.O., 1972 - Tannins as gibberellin antagonist. Plant Physiol., 49, 323-327.

CREASY L.L., 1968 - The significance of carbohydrate metabolism in flavonoid synthesis in strawberry leaf disks. Phytochemistry, 7, 1743-1749.

CREASY L.L. et SWAIN T., 1966 - Flavan production in strawberry leaves. Phytochemistry, 5, 501-504.

DADAK V., 1967 - Effect of natural coumarins on growth respiration and phosphorylation of yeast. Pharmazie, 22, 47-50.

De JONG D.W., 1973 - Modification of tobacco leaf glycolate oxidase activity by chlorogenic acid and other polyphenols. Physiol., Plant, 29, 150-156.

De la FUENTE R.K. et LEOPOLD A.C., 1970 - Turnover in the transportable pool of auxin. Plant Physiol., 45, 642-643.

DEMOS E.K., WOOLWINE M., WILSON R.H. et Mac MILLAN C., 1975 - The effects of ten phenolic compounds on hypocotyl growth and mitochondrial metabolism of mung bean. Amer. J. Bot., 62, 97-102.

DOHRMANN U. et RAY P.M., 1976 - An assay for auxin-binding to solubilized receptor sites of corn membranes. Plant Physiol., Suppl., 57, p. 70.

DOUMENJOU N., 1977 - Polyphénols et métabolisme auxinique chez Lycopersicum esculentum Mill. Thèse Doct. Spé., Toulouse

DOUMENJOU N. et MARIGO G., 1978 - Relations polyphénols - croissance : rôle de l'acide chlorogénique dans le catabolisme auxinique. Physiol. vég., 16, 319-331.

ENGELSMA G., 1965 - The influence of light of different spectral regions on the synthesis of phenolic compounds in gherkin seedlings in relation to photomorphogenesis. III. Hydroxylation of cinnamic acid. Acta Bot. Neerl., 15, 394-405.

ENGELSMA G., 1969 - The influence of light of different spectral regions on the synthesis of phenolic compounds in gherkin seedlings in relation to photomorphogenesis. VI. Phenol synthesis. Acta Bot. Neerl., 18, 347-352.

ENGELSMA G. et MEIJER G., 1965 - The influence of light of different spectral regions on the synthesis of phenolic compounds in gherkin seedlings in relation to photomorphogenesis. II. Indolacetic acid oxidase and growth. Acta Bot. Neerl., 15, 394-405.

EVANS J. et ALLDRIDGE N., 1964 - The distribution of peroxydases in extreme dwarf and normal tomato (Lycopersicum esculentum Mill.). Phytochemistry, 4, 499-503.

EVANS M.L. et HOKANSON R., 1969 - Timing of the response of coleoptiles to the application and withdrawal of various auxins. Planta, 85, 85-95.

FARKAS G.L. et KIRALY Z., 1962 - Role of phenolic compounds in the physiology of plant diseases and disease resistance. Phytopathol. Z., 44, 105-110.

FELDMAN A.W. et HANKS R.W., 1970 - Attempts to increase tolerance of grapefruit seedlings to the burrowing nematode (Radopholus similis) by application of phenolics. Phytochemistry, 10, 701-709.

FERNQUIST I., 1966 - Studies on factors in adventitious root formation. Lantbrukshögsk. Ann., 32, 109-244.

FRANK L.H. et De MOSS R.D., 1957 - Specific enzymic method for the estimation of L-tryptophan. Arch. Biochem. Biophys., 67, 387-397.

FUCHS A. et De VRIES F.W., 1968 - Metabolism of radioactively labeled quinic acid and shikimic acid in healthy and Fusarium infected tomato plants. Neth. J. Path., 75, 186-192.

FURUYA M., GALSTON A.W. et STOWE B.B., 1962 - Isolation from peas of co-factors and inhibitors of indolyl-3-acetic acid oxidase. Nature, 193, 456-457.

GADAL P., 1970 - Sur le métabolisme du chêne et de ses Zoocécidies. Etude particulière de la biosynthèse des acides aminés aromatiques. Thèse Doct. Sci. nat., Toulouse.

GAITONDE M.K. et GORDON M.W., 1964 - A microchemical method for detection and determination of shikimic acid. J. Biol. Chem., 42, 1043-1050.

GALSTON A.W., 1969 - Flavonoids and photomorphogenesis in peas. In. Perspectives in phytochemistry. J.B. HARBORNE and T. SWAIN, eds. Academic Press, London, pp. 193-204.

GALSTON A.W. et DAVIES P.J., 1969 - Hormonal regulation in higher plants. Science, 163, 1288-1297.

GASPAR T., BASTIN M. et LEYH C., 1964 - Composés phénoliques, acide β-indole acétique et activité auxines-oxydasiques. Bull. Acad. Roy. Belgique Cl. Sci., 50, 799-815.

GELINAS D.A., 1973 - Proposed model for the peroxidase catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid in the presence of the inhibitor ferulic acid. Plant Physiol., 51, 967-972.

GELINAS D.A. et POSTLETHWAIT S.N., 1969 - IAA oxidase inhibitors from normal and mutant maize plants. Plant Physiol., 44, 1553-1559.

GLASS A.D., 1973 - Influence of phenolic acids upon ion uptake. I. Inhibition of phosphate uptake. Plant Physiol., 51, 1037-1041.

GLASS A.D., 1974 a - Influence of phenolic acids upon ion uptake. III. Inhibition of potassium absorption. J. Exp. Bot., 25, 1104- 1113.

GLASS A.D., 1974 b - Influence of phenolic acids upon ion uptake. IV. Depolarization of membrane potentiels. Plant Physiol., 54, 855-858.

GOLDSMITH M.H.M., 1968 - Comparison of aerobic and anaerobic movement of 3-indole acetic acid in coleoptiles of oats and corn. In. Biochemistry and physiology of plant growth substances. WIGHTMAN F. and SETTERFIELD G., eds, Ottawa, Runge, pp. 1037-1050.

GOLDSMITH M.H.M., 1977 - The polar transport of auxin. Annu. Rev. Plant Physiol., 28, 439-478.

GOLDSMITH M.H.M. et RAY P.M., 1973 - Intracellular localization of the active process in polar transport of auxin. Planta, 111, 297-314.

GOOD N.E., ANDREAE W.A. et Van YSSELSTEIN M.L.H., 1956 - Studies on 3-indoleacetic acid metabolism. II. Some products of the metabolism of exogenous indoleacetic acid in plant tissues. Plant Physiol., 31, 231-235.

GORDON A. et PALEG G., 1961 - Formation of auxin from tryptophan through action of polyphenol. Plant Physiol., 36, 838-845.

GORTER C.J., 1962 - Further experiments on auxin-synergists. Physiol. Plant., 15, 88-95.

GORTER C.J., 1969 - Auxin synergists in the rooting of cuttings. Physiol. Plant., 22, 497-502.

GORTNER W.A., KENT M.J. et SUTHERLAND G.K., 1958 - Ferulic and p-coumaric acids in pineapple tissue as modifiers of pineapple indoleacetic acid oxidase. Nature, 181, 630-631.

GREEN F.B. et CORCORAN M.R., 1975 - Inhibitory action of five tannins on growth induced by several gibberellins. Plant Physiol., 56, 801-806.

GRUNWALD C. et LOCKARD R.G., 1973 - Synergism between gibberellin and auxin in the growth of intact tomato. Physiol. Plant., 29, 64-67.

GUDIN C. et HARADA H., 1974 - Presence de substances de type auxinique dans le pétrole. C. R. Acad. Sci. Paris, 278, 1229-1231.

GUNSALUS I.C., GALEENER C.C. et STAMER J.R., 1955 - Tryptophan cleavage. Methods in Enzymol., 2, 238-242.

HARA M., UMETSU N., MIYAMOTO C. et TAMARI K., 1973 - Inhibition of the biosynthesis of plant cell wall materials, especially cellulose biosynthesis, by coumarin. Plant Cell Physiol., 14, 11-28.

HARADA H. et KOIZUMI T. 1971 - Effects of cinnamic acid derivatives on the geo- and phototropism and the germination of Lactuca sativa L. c.v. Grand rapids. Z. Pflanzenphysiol., 64, 350-357.

HARBORNE J.B., 1964 - Biochemistry of phenolic compounds. Academic Press, London and New York.

HARBORNE J.B., MABRY T.J. et MABRY H., 1975 - The flavonoids. Chapman and Hall, London.

HARDIN J.W., CHERRY J.H., MORRE D.J. et LEMBI C.A., 1972 - Enhancement of RNA polymerase activity by a factor released by auxin from plasma membrane. Proc. natl. Acad. Sc. U.S.A., 69, 3146-3150.

HARTLEY R.D., et JONES E.C., 1976 - Diferulic acid as a compound of cell walls of Lolium multiflorum. Phytochemistry, 15, 1157-1160.

HASHIMOTO T. et WAKIMORI H., 1976 - Effect of batatasins on auxin transport in oat coleoptiles. In. Abstracts of the paper demonstrations of the 9th International conference on Plant Growth Substances. PILET P.E. ed., Lausanne. pp. 128-129.

HEMBERG T., 1951 - Establishment of acid growth inhibiting substances in plant extracts containing auxins by means of the Avena test. Physiol. Plant., 4, 437-445.

HENDERSON J.H. et NITSCH J.P., 1962 - Effect of certain phenolic acids on the elongation of Avena first internodes in the presence of auxins and tryptophan. Nature, 195, 780-782.

HERTEL R., DOHRMANN U., JESAITIS A.J..et PETERSEN W., 1976 - Various receptor sites in membrane fractions from corn coleoptiles : in vitro binding of auxins, riboflavin and an naturally occuring analog of Morphactin. In. Abstracts of the paper demonstrations of the 9th International conference on Plant Growth substances. PILET P.E. ed., Lausanne. pp 140 a - 140 c.

HERTEL R., EVANS M.L., LEOPOLD A.C. et SHELL H.M., 1969 - The specificity of the auxin transport system. Planta, 85, 238-249

HERTEL R. et FLORY R., 1968 - Auxin movement in corn coleoptiles. Planta, 82, 123-144.

HERTEL R. et LEOPOLD A.C., 1963 - Versuche zur analyses des Auxintransports in der Koleoptile von Zea mays L. Planta, 59, 535-562.

HERTEL R., THOMSON K. et RUSSO V.E.A., 1972 - In vitro auxin binding to particulate cell fractions from corn coleoptiles. Planta, 107, 325-340.

HESS C.E., 1965 - Rooting cofactors - identification and function. Proc. Intern. Plant Prop. Soc., 15, 181-186.

HILLMAN W.S. et GALSTON A.W., 1957 - Inductive control of indoleacetic acid oxidase activity by red and near infrared light. Plant Physiol., 32, 129-131.

HOAGLAND D.R. et ARNON D.L., 1950 - The water culture method for growing plants without soil. Calif. Agric. Exp. Stn. Circ., 374, 4-30.

HOGETSU T., SHIBAOKA H. et SHIMOKORIYAMA M., 1974 - Involvement of cellulose synthesis in actions of gibberellin and kinetin on cell expansion. Gibberellin - coumarin and kinetin-coumarin interactions on stem elongation. Plant Cell Physiol., 15, 265-272.

IHL M., 1976 - Indole-acetic acid binding proteins in soybean cotyledon. Planta, 131, 223-228.

IMBERT M.P. et WILSON L.A., 1970 - Stimulatory and inhibitory effects of scopoletin on IAA-oxidase preparations from sweet potato. Phytochemistry, 9, 1787-1794.

ISAIA A., 1971 - Influence comparée de l'acide abscissique de la coumarine, de l'acide p-coumarique et de certains de leurs dérivés sur la croissance de la première feuille de Blé. Planta, 96, 175-182.

ISHERWOOD J., 1960 - The formation of lignin in plant tissues. In. Phenolics in plants in health and disease. PRIDHAM J.B. ed., London Pergamon, pp. 57-66.

JONES O.P., 1976 - Effect of phloridzin and phloroglucinol on apple shoots. Nature, 262, 392-393.

KAJINAMI S., WENDER S.H. et SMITH E.C., 1971 - Inhibition of glucose 6-phosphate dehydrogenase from tobacco tissue culture by scopoletin ans scopolin. Phytochemistry, 10, 1501-1503.

KALDEWEY H. et KRAUS L., 1972 - Translocation and immobilization of radiocarbon in the hypocotyl and the primary root of Gossypium hirsutum L. after application of IAA-2 ^{14}C to intact light grown seedlings. In. Hormonal regulation in plant growth and development. KALDEWEY H. and VARDAR Y. eds., Verlag Chemie, Weinheim, pp. 137-153.

KASAMO K., et YAMAKI T. 1976 - In vitro binding of IAA to plasma membrane rich fractions containing Mg^{++} activated ATPase from mung bean hypocotyls. Plant Cell Physiol., 17, 149-164.

KEFELI V.I. et KADYROV C.S., 1971 - Natural growth inhibitors, their chemical and physiological properties. Annu. Rev. Plant Physiol., 22, 185-196.

KEITT G.W. et BAKER R.A., 1966 - Auxin activity of substituted benzoic acids and their effect on polar auxin transport. Plant Physiol., 41, 1561-1569.

KHURANA J.P. et MAHESHWARI S.C., 1978 - Induction of flowering in Lemna paucicostata by salicylic acid. Plant Science Letters, 12, 127-131.

KNEGT E. et BRUINSMA J., 1973 - A rapid sensitive and accurate determination of indolyl-3-acetic acid. Phytochemistry, 12, 753-756.

KONISHI M. et GALSTON A.W., 1964 - Light induced changes in phenolic inhibitors of indoleacetic acid oxidase in cotyledons of Pharbitis Nil. Phytochemistry, 3, 559-568.

KOSUGE T., 1969 - The role of phenolics in host response to infection. Ann. Rev. Phytopathol., 7, 195-222.

KOVES E., SIROKMAN F. et MILASSIN M., 1972 - Connection between the growth regulating action of plant phenolic compounds and the protein synthesis. Z. Pflanzenphysiol., 67, 370-372.

KURKDJIAN A. et GUERN J., 1978 - Intracellular pH in higher plant cells. I. Improvements in the use of the 5,5-dimethyloxazolidine 2 (^{14}C) 4-dione distribution technique. Plant Sciences Letters, 11, 337-344.

LAYNE E., 1957 - Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In. Methods in enzymology Part III. COLOWICK S.P. and KAPLAN N.O. eds., Academic Press Inc., Publishers New York. pp. 447-454.

LEBRETON P., JAY M. et VOIRIN B., 1967 - Sur l'analyse qualitative et quantitative des flavonoïdes. Chimie Analytique, 49, 375-383.

LEE T.T., ROCK G.L. et STOESSL A., 1978 - Effects of orchinol and related phenantrenes on the enzymic degradation of indole-3-acetic acid. Phytochemistry, 17, 1721-1726.

LEE T.T. et SKOOG F., 1965 - Effects of hydroxy benzoic acids on indole-acetic acid inactivation by tobacco callus extracts. Physiol. Plant., 18, 577-585.

LEGUAY J.J., 1977 - The 5,5-dimethyloxazolidine 2-(^{14}C), 4-dione distribution technique and the measurement of intracellular pH in Acer pseudoplatanus cells. Biochim. Biophys. Acta, 497, 329-333.

LEOPOLD A.C. et de la FUENTE R.K., 1968 - A view of polar auxin transport. In. Transport of plant hormones. VARDAR Y. ed. Amsterdam, North Holland Publ. pp. 24-47.

LEOPOLD A.C. et KRIEDEMANN P.E., 1975 - Plant growth and development. Mac Graw Hill Book C° ed., New York, St Louis, San Francisco.

LESCURE A.M., 1970 - Cinétique enzymatique des 3-indolyl-acétique oxydases de deux lignées de cellules d'Acer pseudoplatanus , dépendantes ou indépendantes de l'auxine. Bull. Soc. Chim. Biol., 52, 953-978.

LIEBERMAN M. et BIALE J.B., 1956 - Oxidative phosphorylation by sweet potato mitochondria and its inhibition by polyphenols. Plant Physiol., 31, 420-424.

LOOMIS W.D. et BATAILLE J., 1966 - Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. Phytochemistry, 5, 423-438.

Mac CLURE J.W., 1975 - Physiology and functions of flavonoids. In. The flavonoids. HARBORNE J.B., MABRY T.J. and MABRY H. eds., Chapman et Hall, London, pp. 970-1043.

MACE M.E., 1965 - Isolation and identification of 3-indoleacetic acid from Fusarium oxysporum f. cubense. Phytopathology, 55, 240-241.

MACHACKOVA I., GANEEVA K. et ZMRHAL Z., 1975 - The role of peroxidase in the metabolism of indole-3-acetic acid and phenols in wheat Phytochemistry, 14, 1251-1254.

MACHEIX J.J., 1968 - Quelques observations sur les composés phénoliques des pommes : recherches preliminaires à une étude particulière de l'acide chlorogénique. Fruits, 23, 13-20.

MAPSON L.W. et MEAD A., 1968 - Biosynthesis of ethylene. Dual nature of cofactor required for the enzymic production of ethylene from methional. Biochem. J., 108, 875-881.

MAPSON L.W. et WARDALE D.A., 1967 - Biosynthesis of ethylene. Formation of ethylene from methional by a cell free enzyme system from cauliflower florets. Biochem. J., 102, 574-585.

MAPSON L.W. et WARDALE D.A., 1968 - Biosynthesis of ethylene. Enzymes involved in its formation from methional. Biochem. J., 107, 433-442.

MARBACH I. et MAYER A.M., 1974 - Permeability of seed coats to water as related to drying conditions and metabolism of phenolics. Plant Physiol., 54, 817-820

MARBACH I. et MAYER A.M., 1975 - Changes in catechol oxidase and permeability to water in seed coats of Pisum eliatus during seed development and maturation. Plant Physiol., 56, 93-96.

MARIGO G., 1973 - Sur une méthode de fractionnement et d'estimation des composés phénoliques chez les végétaux. Analusis, 2, 106-110.

MARIGO G., 1976 - Relations polyphénols - croissance chez Lycopersicum esculentum Mill. Examen d'un rôle régulateur des acides phénoliques. C. R. Acad. Sci. Paris, 283, 239-242.

MARIGO G., ALIBERT G. et BOUDET A., 1969 - Recherches sur la biosynthèse des composés aromatiques chez les végétaux supérieurs : origine des acides protocatéchique et gallique chez Quercus pedunculata Ehrh. C. R. Acad. Sci. Paris, 269, 1852-1854.

MARIGO G. et BOUDET A.M., 1975 - Rôle des polyphénols dans la croissance. Définition d'un modèle expérimental chez Lycopersicum esculentum. Physiol. Plant., 34, 51-55.

MARIGO G. et BOUDET A.M., 1977 - Relations polyphénols - croissance. Mise en évidence d'un effet inhibiteur des composés phénoliques sur le transport polarisé de l'auxine. Physiol. Plant., 41, 197-202.

MARIGO G. et BOUDET A.M., 1978 - Effects of an increase in levels of phenolic compounds on the auxin content and growth of Lycopersicum esculentum. Accepté pour publication dans Z. Pflanzenphysiol.

MARIGO G., ROSSIGNOL M. et BOUDET A.M., 1975 - Métabolisme des depsides de l'acide quinique chez Lycopersicum esculentum Mill. Qual. Plant- Pl. Fds. Hum. Nutr., 25, 211-218.

MARINOS N.G. et HEMBERG T., 1960 - Observations on a possible mechanism of action of the inhibitor β complex. Physiol. Plant., 13, 571-581.

MATO M.C., 1970 - Action of resorcylic acids on the auxin-oxidase activity. Phytochemistry, 9, 275-277.

MATTA A. et GENTILE I., 1964 - Variation in auxin content induced in tomato by Fusarium oxysporum f.s.p. lycopersici. Rev. Appl. Mycol., 44, 233-239.

MAYER A.M. et POLJAKOFF-MAYBER A., 1963 - The germination of seeds. Oxford, Pergamon Press.

MESNARD P. et DEVAUX G., 1963 - Application de la réaction thiobarbiturique au dosage de l'acide quinique et de ses esters caféiques. C. R. Acad. Sci., Paris, 256, 1551-1553.

MICHNIEWICZ M. et GALOCH E., 1974 - The role of vanillin and p-coumaric acid in the growth of scotch pine seedlings. Acta Soc. Bot. 2, 273-281.

MINAMIKAWA T. et YOSHIDA S., 1972 - Alicyclic acid metabolism in plants. 4. Effect of external supplies of shikimate and quinate to excised hypocotyls of Phaseolus mungo seedlings. Plant Cell Physiol., 13, 673-679.

MOLISH H., 1937 - Der Einfluss einer Pflanze auf die andere. Allelopathie Fischer, Jena.

MORELAND A., 1967 - Mechanism of action of herbicides. Annu. Rev. Plant Physiol., 18, 365-386.

MORGAN P.W. et DURHAM J.I., 1972 - Abscission : potentiating action of auxin transport inhibitors. Plant Physiol., 50, 313-318.

MORRIS D.A., BRIANT R.E. et THOMSON P.G., 1969 - The transport and metabolism of ^{14}C labelled indoleacetic acid in intact pea seedlings. Planta, 89, 178-197.

MORRIS D.A., KADIR G.O. et BARRY A.J., 1973 - Auxin transport in intact pea seedlings (Pisum sativum L.). The inhibition of transport by 2,3,5 triiodobenzoic acid. Planta, 110, 173-182.

MORRIS D.A. et THOMAS A.G., 1974 - Specificity of auxin transport in intact pea seedlings (Pisum sativum L.). Planta, 118, 225-234.

MSUGE S.G. et VIGLIERCHIO D.R., 1975 - Influence of growth promotors and inhibitors on tomato plants infected with Meloidogyne incognita and M. hapla. Nematologica, 21, 476-477.

MUDGE K.W. et POOVAIAH B.W., 1978 - Auxin binding to a membrane fraction from developing fruits of tomato. Plant physiol., Supp..61, p. 65

MUMFORD F.E. et STARK H.M., 1963 - 4 hydroxybenzyl alcohol a naturally occuring cofactor of indoleacetic acid oxidase. Phytochemistry, 2, 215-220.

MUNFORD I.E., SMITH D.H. et CASTLE J.E., 1961 - An inhibitor of indoleacetic acid oxydase from pea tips. Plant Physiol., 36, 752-756.

NAEF J., 1971 - Influence de quelques flavonoïdes sur la croissance de tissus de Carotte cultivés in vitro. C. R. Acad. Sci. Paris, 272, 1089-1092.

NANDA K.K. et KUMAR S., 1977 - Effect of gibberellic acid and some polyphenols on the flowering of Impatiens balsamina. New Phytol., 78, 403-406.

NANDA K.K., SURINDER K. et SOOD V., 1976 - Effect of gibberellic acid and some phenols on flowering of Impatiens balsamina, a qualitative short day plant. Physiol. Plant., 38, 53-56.

NEUMAN J., 1960 - The nature of the growth promoting action of coumarin. Physiol. Plant., 13, 328-341.

NIEDERGANG-KAMIEN E. et LEOPOLD A.C., 1957 - Inhibitors of polar auxin transport. Physiol. Plant., 10, 29-38.

NITSCH J.P., 1970 - Hormonal factors in growth and development. In. The biochemistry of fruits and their products. Vol. 1, HULME A.C. éd., Academic Press, London, pp. 427-472.

NITSCH J.P. et NITSCH C., 1955 - The separation of natural plant growth substances by paper chromatography. Beitr. Biol. Pflanzen, 31, 387-408.

NITSCH J.P. et NITSCH C., 1959 - Synergie d'action entre les dérivés de l'acide chlorogénique et l'acide 3-indolylacétique. Bull. Soc. Bot. Fr., 106, 414-417.

NITSCH J.P. et NITSCH C., 1962 - Composés phénoliques et croissance végétale. Ann. Physiol. vég., 4, 211-225.

NITSCH J.P. et PARIS R., 1962 - Action de flavonoïdes sur la croissance de tissus de Topinambour cultivés in vitro. Bull. Soc. Bot. Fr., 109, 241-244.

NORMAN G., HARTMANN M.A., SCHUBER F. et BENVENISTE P., 1975 - Caractérisation de membranes de coléoptiles de Maïs fixant l'auxine et l'acide N-naphtyl phtalamique. Physiol. vég., 13, 743-761.

OOSTROM H., Van LOOPIK-DETMERS M.A. et LIBBENGA K.R., 1975 - A high affinity receptor for indoleacetic acid in cultured tobacco pith explants. FEBS Letters, 59, 194-197.

PARIS R.R., HERISSET A. et CHAUMONT J.P., 1968 - Sur les polyphénols (flavonoïdes, acides phénols, coumarines) des capitules de l'Anthemis nobilis I. ; variation au cours de la floraison. C. R. Acad. Sci. Paris, 267, 740-742.

PAULET P., 1965 - Etude de la néoformation in vitro de bourgeons végétatifs et floraux. Thèse Doct. Sci. nat., Paris.

PAULET P., 1966 - Stimulation de la néoformation in vitro de bourgeons végétatifs et floraux chez deux Nicotiana et leur hybride. Congrés Univ. Liège, 38, 323-340.

PAUPARDIN C., 1969 - Sur le moment d'action de l'acide caféique dans la rhizogénèse de fragments de tubercules de Topinambour cultivés in vitro. C. R. Acad. Sci. Paris, 269, 1532-1534.

PAUPARDIN C., 1972 - Contribution à l'étude du rôle des composés phénoliques dans les phénomènes de morphogénèse manifestés par quelques tissus végétaux. Annales des Sciences Naturelles, Botanique et Biologie végétales, XIII, 188-191.

PAUPARDIN C. et TIZIO R., 1970 - Action de quelques composés phénoliques sur la tubérisation de la Pomme de terre. Potato Res., 13, 187-198.

PEGG G.F., 1976 - Endogenous auxins in healthy and diseases plants. In. Physiological Plant Pathology. HEITEFUSS R. and WILLIAMS P.H. eds., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 560-581.

PEGG G.F. et SELMAN I.W., 1959 - An analysis of the growth response of young tomato plants to infection by Verticillium albo atrum. Ann. Appl. Biol., 47, 222-231.

PHILLIPS I.D.J., 1975 - Apical dominance. Annu. Rev. Plant Physiol., 26, 341-367.

PIERPOINT W.S., 1970 - Formation and behaviour of o-quinonines in some processes of agricultural importance. Rep. Rothamsted exp. Stn., 2, 199-218.

PILET P.E., 1957 - Dosage photocolorimétrique de l'acide β-indolyl-acétique : application à l'étude des auxines-oxydases. Rev. Gén. Bot., 64, 106-122.

PILET P.E., 1964 - Effect of chlorogenic acid on the auxin catabolism and the auxin content of root tissues. Phytochemistry, 2, 617-621.

PILET P.E., 1966 - Effect of p-hydroxybenzoic acid on growth, auxin content and auxin catabolism. Phytochemistry, 5, 77-82.

PILET P.E., 1967 - Auxin content and auxin catabolism in relation to the growth polarity. Physiol. Plant., 20, 285-289.

PILET P.E. et ZRYD J.P., 1965 - Distribution des composés sulfhydrilés dans les racines. Ann. Physiol. vég., 7, 241-250.

POPOVICI G. et REZNIK H., 1976 - The effect of some flavonoids on the protoplasmic streaming in oat (Avena sativa) root hairs. Z. Pflanzenphysiol., 80, 417-425.

PRIDHAM J.B., 1960 - Phenolics in plants, in health and disease. PRIDHAM J.B., ed, Pergamon Press, Oxford.

PRYCE R.J., 1972 - Gallic acid as a natural inhibitor of flowering in Kalanchoe blossfeldiana. Phytochemistry, 11, 1911-1918.

RABIN R.S. et KLEIN R.M., 1957 - Chlorogenic acid as a competitive inhibitor of indoleacetic acid oxidase. Arch. Biochem. Biophys. 70, 11-15.

RAVEN J.A., 1975 - Transport of indoleacetic acid in plant cells in relation to pH and electrical potential gradients and its significance for polar IAA transport. New Phytol., 74, 163-172.

RAVEN J.A. et SMITH F.A., 1974 - Significance of hydrogen ion transport in plant cells. Can. J. Bot., 52, 1035-1048.

RAY P.M. et DOHRMANN U., 1977 - Characterization of naphthaleneacetic acid binding to receptor sites on cellular membranes of Maize coleoptile tissue. Plant Physiol., 59, 357-364.

REED H.S., 1959 - The action of quinones on mitosis. Experientia, 5 237-239.

RHODES M.J.C. et WOLLTORTON L.S.C., 1973 - Stimulation of phenolic acid and lignin biosynthesis in swede root tissue by ethylene. Phytochemistry, 12, 107-118.

RICE E.L., 1974 - Allelopathy. Physiological ecology. RICE E.L. ed., Academic Press, New York, San Francisco, London.

RIDGE I. et OSBORNE D., 1970 - Hydroxyproline and peroxidases in cell walls of Pisum sativum : regulation by ethylene. J. Exp. Bot., 21, 843-856.

RITZERT L., 1972 - Indole-3-acetic acid oxidase activity from developing peach seeds and its inhibition by extractable catechin. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 97, 153-157.

ROBERT M.L., TAYLOR H.F. et WAIN L.R., 1976 - The effect of certain phenolic acids on the growth and ethylene production of cress seedlings roots. Planta, 131 , 132-135.

ROVIRA A.D., 1969 - Plant root exudates. Bot. Rev., 35, 35-57.

ROY P. et BISWAS B.B., 1977 - A receptor protein for indoleacetic acid from plant chromatin and its role in transcription. Biochem. Biophys. Res. Comm., 74, 1597-1606.

RUBERY P.H. et SHELDRAKE A.R., 1973 - Effect of pH and surface charge on cell uptake of auxin. Nature New Biol., 244, 285-288.

RUBERY P.H. et SHELDRAKE A.R., 1974 - Carrier mediated auxin transport. Planta, 118, 101-121.

RUCKER W. et PAUPARDIN C., 1969 - Action de quelques acides phénols sur la rhizogénèse des tissus de tubercules de Topinambour (var. Violet de Rennes) cultivés in vitro. C. R. Acad. Sci. Paris, 268, 1279-1281.

RUNKOVA L.V., LIS E.K., TOMASZEWSKI M. et ANTOSZEWSKI R.,1972 - Function of phenolic substances in the degradation system of indole-3-acetic acid in strawberries. Biol. Plant., 14, 71-81.

RUSSEL D.W. et GALSTON A.W., 1969 - Blockage by gibberellic acid of phytochrome effects on growth, auxin responses, and flavonoid synthesis in etiolated pea internodes. Plant Physiol., 44, 1211-1216.

SACHER J.A., 1963 - Effect of inhibitors on kinetics of indoleacetic acid oxidation. Amer. J. Bot., 50, 116-122.

SAKURAI N., SHIBATA K. et KAMISAKA S., 1974 - Stimulation of cucumber hypocotyl elongation by dihydroconiferyl alcohol. Interactions between dihydroconiferyl alcohol and auxin or gibberellin. Plant Cell Physiol., 15, 709-716.

SARKANEN K.V. et LUDWIG C.H., 1971 - Lignins, occurence, formation structure and reactions. WILEY Interscience ed., New York, London, Sydney and Toronto.

SCHAEFFER G.W., BUTA J.G. et SHARPE F., 1967 - Scopoletin and polyphenol induced lag in peroxidase catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid. Physiol. Plant., 20, 342-347.

SCHNEIDER V., 1971 - Die Wirkung der unspezifisch mit Proteinen reagierenden Tannine auf photosynthetische Reaktionen der Chloroplastenlamellarsysteme. Z. Pflanzenphysiol., 64, 1-14.

SCHNEIDER V., 1973 - In vitro inhibition of photophosphorylation by kaempferol. Z. Pflanzenphysiol., 70, 88-93.

SCHNEIDER A., GIBSON R.A. et WIGHTMAN F., 1972 - Biosynthesis and metabolism of indol-3-yl-acetic acid. I. The native indoles of barley and tomato shoots. J. Exp. Bot., 23, 152-170.

SCHNEIDER A. et WIGHTMAN F., 1974 - Metabolism of auxin in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol., 25, 485-513.

SCOTT T.K., 1972 - Auxins and roots. Annu.Rev. Plant Physiol., 23, 235-258.

SHEN-MILLER J., 1973 - Rhythmycity in the basipetal transport of indoleacetic acid through coleoptiles. Plant Physiol., 51, 615-619.

SHEN-MILLER J., COOPER P. et GORDON S.A., 1969 - Phototropism and photoinhibition of basipolar transport of auxin in oat coleoptiles. Plant Physiol., 44, 491-496.

SHIBATA K., KUBOTA T. et KAMISAKA S., 1974 - Isolation and chemical identification of a lettuce cotyledon factor, a synergist of the gibberellin action in inducing lettuce hypocotyl elongation. Plant Cell Physiol., 15, 191-194.

SIEGEL S.M., 1956 - Cité par SARKANEN K.V. et LUDWIG C.H., 1917. In. Lignins, occurence, formation, structure and reactions. WILEY Interscience, ed., New York, London, Sydney and Toronto, p. 34.

SIEGEL S.M., FROST P. et PORTO F., 1960 - Effects of indoleacetic acid and other oxidation regulators on in vitro peroxidation and experimental conversion of eugenol to lignin. Plant Physiol., 35, 163-167.

SIEGEL S.M. et PORTO F., 1961 - Oxidants, antioxidants and growth regulation. In. Plant growth regulation. KLEIN R.M. ed., Iowa State University Press Amer. pp. 341-353.

SPURR H.W., HILDEBRAND A.C. et RIKER A.J., 1965 - The integral association of chlorogenic acid to crown gall tumor formation. Phytopathology, 55, 1004-1008.

STAFFORD H.A., 1965 - Factors controlling the synthesis of natural and induced lignins in Phleum and Elodea. Plant Physiol., 40, 844-851.

STAFFORD H.A., 1967 - Biosynthesis of phenolic compounds in first internodes of Sorghum : lignin and related products. Plant Physiol., 42, 450-455.

STENLID G., 1963 - The effects of flavonoid compounds on oxidative phosphorylation and on the enzymatic destruction of indoleacetic acid. Physiol. Plant., 16, 110-120.

STENLID G., 1970 - Flavonoids as inhibitors of the formation of adenosine triphosphate in plant mitochondria. Phytochemistry, 9, 2251-2256.

STENLID G., 1976 - Effects of flavonoids on the polar transport of auxins. Physiol. Plant., 38, 262-266.

STENLID G. et SADDIK K., 1962 - The effect of some growth regulators and uncoupling agents upon oxidative phosphorylation in mitochondria of Cucumber hypocotyls. Physiol. Plant., 15, 369-379.

STOESSL A. et VENIS M.A., 1970 - Determination of submicrogram levels of indole-3-acetic acid : a new highly specific method. Anal. Biochem., 34, 344-351.

STONIER T., 1972 - The role of auxin protectors in autonomous growth. In. Les cultures de tissus de plantes (Proceed. of the Second Internat. Conf. on plant tissue culture, Strasbourg, France) HIRTH M.L. and MOREL G. eds., Colloq. Internat. C.N.R.S. N° 193 pp. 423-435.

STONIER T., SINGER R.W. et YANG H.M., 1970 - Studies on auxin protectors. IX. Inactivation of certain protectors by polyphenol oxidase. Plant Physiol., 46, 456-457.

STONIER T., et YANG H., 1972 - Studies on auxin protectors. X. Protector levels and lignification in sunflower crowngall tissues. Physiol. Plant., 25, 474-481.

STONIER T. et YANG H., 1973 - Studies on auxin protectors. XI. Inhibition of peroxidase-catalyzed oxidation of glutathione by auxin protectors and o-dihydroxyphenols. Plant Physiol., 51, 391-395.

SVENSSON S.B., 1971 - The effect of coumarins on root growth and root histology. Physiol. Plant., 24, 446-470.

SWAIN T., 1953 - The identification of coumarins and related compounds by filter-paper chromatography. Biochem. J., 53, 200-207.

SWAIN T., 1977 - Secondary compounds as protective agents. Annu. Rev. Plant Physiol., 28, 479-501.

SWAIN T. et HILLIS W.E.J., 1959 - Phenolic constituents of Prunus domestica. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. J. Sci. Food Agric., 10, 63-68.

TAFURI F., BUSINELLI M. et SCARPONI L., 1972 - Effect of caffeic and p-coumaric acids on indole-3-acetic acid catabolism. J. Sci. Food Agric., 23, 1417-1423.

THIMANN K.V. et BONNER W.D. Jr., 1949 - Inhibition of plant growth by protoanemonin and coumarin, and its prevention by BAL. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.) 35, 272-276.

TOMASZEWSKI M., 1964 - The mechanism of synergistic effects between auxin and some natural phenolic substances. Congrés C.N.R. . Sur "Les régulateurs naturels de la croissance végétale" Gif sur Yvette, pp. 335-351.

TOMASZEWSKI M. et THIMANN K.V 1966 - Interactions of phenolic acids metallic ions and chelating agents on auxin-induced growth. Plant Physiol., 41, 1443-1454.

TORREY J.G., FOSKET D.E. et HEPLER P.K., 1971 - Xylem formation : paradigm of cytodifferentiation in higher plants. Amer. Scientist., 59, 338-352.

TRONCHET J., 1969 - Effets de blessures, scarifications ou abrasion au carborandum sur le contenu flavonoïdique de limbes de Lycopersicum esculentum Mill. Ann. Sci. Univ. Besançon, 6, 20-39.

TUKEY H.B., 1970 - The leaching of substances from plants. Annu. Rev. Plant Physiol., 21, 305-324.

Van der WOUDE W.J., LEMBI C.A. et MORRÉ D.J., 1972 - Auxin (2,4 D) stimulation (in vivo and in vitro) of polysaccharide synthesis in plasma membrane fragments isolated from onion stem. Biochem. Biophys. Res. Comm., 46, 246-253.

Van FLEET D.S., 1954 - The significance of the histochemical localization of quinones in the differentiation of plant tissues. Phytomorphology, 4, 300-310.

Van SUMERE C.F., COTTENIE J., De GREEF J. et KINT J., 1972 - Biochemical studies in relation to the possible germination regulatory role of naturally occuring coumarin and phenolics. Recent advances in phytochemistry, 4, 165-221.

VARGA M. et KOVES E., 1962 - Effect of phenolic compounds on the activity of indoleacetic acid oxidase. Acta Biol. Acad. Sci., 13, 273-281.

VASQUEZ A., 1973 - Effect of umbelliferone on rooting bean cuttings. Plant Science Letters, 1, 433-438.

VASQUEZ A., 1974 - Effect of umbelliferone as rooting stimulator, on endogenous growth substances in bean cuttings. Biol. Plant., 16, 308-311.

VENDRIG J.C. et BUFFEL K., 1961 - Growth stimulating activity of transcaffeic acid isolated from Coleus rhenaltianus. Nature, 192, 276-277.

VIEITEZ E., SEOANE E., GESTO D.V., MATO C., VASQUEZ A. et CARNICER A., 1966 - p-hydroxybenzoic acid, a growth regulator, isolated from woody cuttings of Ribes rubrum. Physiol. Plant., 19, 294-307.

WADA S., 1961 - IAA oxidase inhibitors contained in rice coleoptiles. Sci. Rep. Tohoku University, Biol., 27, 237-249.

WADDEL W.J. et BUTTLER T.C., 1957 - The global intracellular pH. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 96, 563-565.

WALKER N.A. et SMITH F.A., 1975 - Intracellular pH in Cleara corallina measured by DMO technique. Plant Sci. Letters, 4, 125-132.

WANGERMANN E., 1974 - The pathway of transport of applied indolylacetic acid through internode segments. New Phytologist, 73, 623-636.

WARDALE D.A., 1973 - Effect of phenolic compounds in Lycopersicum esculentum on the sysnthesis of ethylene. Phytochemistry, 12, 1523-1530.

WARDROP A.B., 1964 - The structure and formation of the cell wall in xylem. In. The formation of wood in forest trees. ZIMMERMAN M.A. ed., Academic Press Inc., New York, pp. 87-134.

WEISSENBOCK G. et SCHNEIDER V., 1974 - Experiments on the localization of flavonoids in plastids. III. Flavonoid content of chloroplasts from Avena sativa L. and the problem of contamination of plastids by flavonoids during isolation. Z. Pflanzenphysiol., 72, 23-25.

WENT F.W., 1928 - Wuchsstoff und Wachstum. Rec. Trav. Bot. Neerl., 25, 1-116.

WHITMORE F.W., 1971 - Lignin formation in wheat coleoptile cell walls. A possible limitation of cell growth. Plant Physiol., 48, 596-602.

WHITMORE F.W., 1974 - Phenolic acids in wheat coleoptiles cell walls. Plant Physiol., 53, 728-731.

WHITMORE F.W., 1976 - Binding of ferulic acid to cell wall by peroxidases of Pinus elliottii. Phytochemistry, 15, 375-378.

WIDHOLM J.M., 1972 - Cultured Nicotiana tabacum cells with an altered anthranilate synthetase which is less sensitive to feedback inhibition. Biochim. Biophys. Acta, 261, 52-58.

WIDHOLM J.M., 1974 - Control of aromatic amino acid biosynthesis in cultured plant tissues : effect of intermediates and aromatic amino acids on free levels. Physiol. Plant., 30, 13-18.

WIGHTMAN F., 1977 - Gas chromatographic identification and quantitative estimation of natural auxin in developping plant organs. In. Plant growth regulation. PILET P.E. ed., Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, pp. 77-90.

WIGHTMAN F. et RAUTHAN B., 1974 - Cité par SCHNEIDER A. et WIGHTMAN F., Metabolism of auxin in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol., 25, 487-513.

WODZICKI T.J. et WODZICKI A.B., 1973 - Auxin stimulation of cambial activity in Pinus silvestris. II. Dependence upon basipetal transport. Physiol. Plant., 29, 288-292.

YONEDA Y. et STONIER T., 1967 - Distribution of three auxin protector substances in seeds and shoots of the japanese morning Glory (Pharbitis mil.). Plant Physiol., 42, 1017-1020.

ZENK M.H. et MÜLLER G., 1963 - In vivo destruction of exogenously applied indolyl-3-acetic acid as influenced by naturally occuring phenolic acids. Nature, 200, 761-763.

ZUCKER M., 1963 - The influence of light on synthesis of protein and of chlorogenic acid in potato tuber tissue. Plant Physiol., 38, 575-580.

ZUCKER M. et LEVY C.C., 1959 - Some factors which affect the synthesis of chlorogenic acid in disks of potato tubers. Plant Physiol., 34, 108-112.

ZUCKER M., NITSCH C. et NITSCH J.P., 1965 - The induction of flowering in Nicotiana. II. Photoperiodic alteration of the chlorogenic acid concentration. Amer. J. Bot., 52, 271-277.

Imprimerie de L'Université Paul Sabatier
Service Général Offset
118, Route de Narbonne 31077 TOULOUSE Cedex